N° d'ordre 246 Série D E

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Michel REVEL

Docteur en Médecine - Licencié ès-Sciences
Assistant à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine
de Strasbourg

PREMIÈRE THÈSE

RECHERCHES SUR LA CORRÉLATION ENTRE LES BIOSYNTHÈSES DU NICOTINAMIDE ADÉNINE DINUCLÉOTIDE ET DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES CHEZ LE RAT

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté :

DONNÉES RÉCENTES SUR LE MÉCANISME DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

Soutenues le 21 Mai 1963 devant la Commission d'examen :

MM. L. HIRTH — Président
J. P. EBEL, M. DAUNE — Examinateurs
P. MANDEL — Invité
Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0030

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Michel REVEL

Docteur en Médecine - Licencié ès-Sciences
Assistant à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine
de Strasbourg

PREMIÈRE THÈSE

RECHERCHES SUR LA CORRÉLATION ENTRE LES BIOSYNTHÈSES DU NICOTINAMIDE ADÉNINE DINUCLÉOTIDE ET DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES CHEZ LE RAT

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté :

DONNÉES RÉCENTES SUR LE MÉCANISME DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

Soutenues le 21 Mai 1963 devant la Commission d'examen :

MM. L. HIRTH — Président
J. P. EBEL, M. DAUNE — Examinateurs
P. MANDEL — Invité
Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MON PERE

Qu'il sache que je suis conscient de tout ce que je lui dois.

A MA FEMME

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur P. MANDEL

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen : Professeur G. MILLOT.

Doyens honoraires: A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.-J. MARESQUELLE.

Professeurs honoraires: Ed. BAUER, P. de BEAUCHAMP, R. BONNET, L. BOUNOURE, H. CARTAN, G. CERF, Cl. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, L. HACKSPILL, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, H. OLLIVIER, G. RIBAUD, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, Et. WOLFF, J. YVON.

Professeurs :

H. WEISS	T.	Physico-chimie des Hydrocarbures
G. HUGEL	T.	Chimie du Pétrole
H.-J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.-H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
L. BOISSELET	T.	Chimie analytique du Pétrole.
A. MAILLARD	T.T.P.	Chimie
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.T.P.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle PEREY M.	T.	Chimie nucléaire
Ph. PLUVINAGE	T.	Physique expérimentale
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physico-chimie Macromoléculaire
J.-L. KOSZUL	T.	Topologie
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle GILLET S.	T.T.P.	Paléontologie
Mlle GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
R. THOM	T.	Analyse supérieure
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	P.S.C.	Chimie biologique

J. BRENET	T.T.P.	Chimie physique
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
Fr. STEPHAN	P.S.C.	Zoologie
Cl. LEVI	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.T.P.	Physique
M. BERGER	T.T.P.	Mathématiques
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.-P. LONCHAMP	P.S.C.	Physique
J. BOSCHER	P.S.C.	Mécanique des Fluides
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.-B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	P.S.C.	Physique
A. ROCHE	P.S.C.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
J. YOCCOZ	T.	Physique théorique
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
J. COGNE	P.S.C.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	P.S.C.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.-P. EBEL	T.	Chimie biologique

Maitres de Conférences :

J. PARROD	Chimie
R. WEY	Chimie
J. WUCHER	Physique
Mme D. MAGNAC	Physique
Mme M. BRINI	Chimie
M. DAUNE	Physique
J.-P. ADLOFF	Chimie nucléaire
J. GREMILLARD	Mathématiques
G. PERNY	Physique
J. LEVISALLES	Chimie
D. BERNARD	Méthodes Mathématiques de la Physique
R. BARO	Physique
G. LAPRAZ	Botanique
H. DANAN	Physique
M. ZISMAN	Mathématiques
E. DANIEL	Physique
F. NORGUET	Mathématiques
P. CHEVALLIER	Physique
J. LERAY	Physique
H. DURANTON	Botanique
R. WEISS	Chimie
P. CARTIER	Mathématiques
J.-P. SCHWING	Chimie
M. SIESKIND	Physique
G. MONSONEGO	Physique mathématique
P. GABRIEL	Mathématiques

Secrétaire : G. SAINT-PE.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS XI

INTRODUCTION 1

METHODES ET TECHNIQUES

CHAPITRE I: Etudes sur le rein entier

A. — Animaux d'expériences 3

B. — Conditions expérimentales

1) Administration de la nicotinamide 4

2) Administration du 32 P-Phosphate 4

3) Nephrectomie 4

C. — Dosages biochimiques 5

CHAPITRE II: Etudes subcellulaires.

A. — Fractionnement cellulaire 11

B. — Méthodes de fractionnement nucléaire

1) Méthode au phénol 12

2) Méthode d'Allfrey et Mirsky 12

C. — Techniques physico-chimiques de fractionnement de l'ARN 13

1) Préparation de l'ARN nucléaire 14

2) Chromatographie sur albumine méthylée-kieselguhr 14

3) Ultracentrifugation en gradient de saccharose 15

D. — Etudes in vitro sur les noyaux isolés 15

RECHERCHES ET RESULTATS

CHAPITRE I: Existence d'une corrélation ARN-NAD.

A. — Synthèse de NAD après injection de nicotinamide 19

B. — Effets de la nicotinamide sur la synthèse de l'ARN 22

C. — Effets de la nicodinamide sur la synthèse d'ARN au cours de l'hypertrophie rénale compensatrice 24

1. Hypertrophie rénale brève 25

2. Hypertrophie rénale de longue durée 28

D. — Effet de l'hypertrophie rénale compensatrice sur la synthèse de NAD 31

E. — Localisation subcellulaire de l'effet de la nicotinamide 33

CHAPITRE II: Etude de la corrélation ARN-NAD dans le noyau

I. IN VIVO

A. — Le métabolisme des ARN du noyau
1) Etude globale de l'ARN nucléaire rénal 35
2) Recherche d'un fractionnement nucléaire 37
a) Fractionnement d'un noyau cellulaire 37
b) Fractionnement de l'ARN nucléaire 42
c) Conclusions 54

B. — La Corrélation ARN-NAD dans le noyau cellulaire
1) Localisation intranucléaire 56
a) Fractionnement chromatographique de l'ARN nucléaire 57
b) Fractionnement nucléaire 60
2) Relations nucleo-cytoplasmiques 61

II. IN VITRO

A. — Etude de l'incorporation des précurseurs marqués dans l'ARN
1) Etude globale 63
2) Fractionnement nucléaire 64
3) Etude de l'ARN So 67

B. — Corrélation des synthèses in vitro de NAD et d'ARN dans les noyaux isolés 72
1) Formation du NAD in vitro 73
2) Relation ARN-NAD 73
3) Effet du NMN sur l'ATP nucléaire 74
4) Effet de la bentonite 76
5) Etude du mécanisme de la relation ARN-NAD 78

DISCUSSION

A. — Biochimie de la croissance: rôle de l'ARN 81

B. — Synthèse du NAD 83

C. — L'équilibre ARN-NAD 85
1) Localisation 85
2) Mécanisme 87
3) Signification de l'équilibre ARN-NAD 90

RESUME ET CONCLUSIONS 97

BIBLIOGRAPHIE 101

ABREVIATIONS

AN	:	acides nucléiques
ARN	:	acide ribonucléique
ADN	:	acide desoxyribonucléique
ATP	:	adénosine triphosphate
AMP	:	adénosine monophosphate
NP	:	nucléotide à pyridine
NA	:	acide nicotinique
NAD	:	nicotinamide adénine dinucléotide (DPN)
NADP	:	anciennement TPN. nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaAD	:	acide nicotinique adénine dinucléotide
NMN	:	nicotinamide mononucléotide
NaMN	:	acide nicotinique mononucléotide
PRPP	:	phosphoribosylpyrophosphate
UTP	:	uridine triphosphate
GTP	:	guanosine triphosphate
CTP	:	cytidine triphosphate
Tris	:	tampon tris hydroxy amino méthane-HCl
PEP	:	phosphoénolpyruvate de Na
HRC	:	hypertrophie rénale compensatrice
uC	:	microcurie
μM	:	micromole

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé à l'institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Strasbourg sous la direction du Professeur P. MANDEL. Il s'inscrit dans le cadre des recherches sur le métabolisme des acides nucleiques auxquelles ce laboratoire s'est en partie consacré, et dans lequel Monsieur le Professeur Mandel nous a guidé.

Nous tenons à remercier MM. les Professeurs L. HIRTH, J. P. EBEL et M. DAUNE de nous avoir fait l'honneur d'examiner et de juger le présent travail.

Nous voulons exprimer notre amicale reconnaissance à tous les membres de l'Institut de Chimie Biologique. Que Monsieur le Professeur agrégé J. D. WEILL veuille trouver ici l'expression de notre amitié et de notre gratitude. Nous lui devons beaucoup ainsi qu'au Professeur agrégé P. CHAMBON qui nous a toujours manifesté sa sympathie. Nous tenons à rendre hommage à Madame L. MANDEL, Docteur en Médecine, Docteur es-Sciences, qui nous a accueilli à notre arrivée au laboratoire en 1956.

Mlle S. DREYFUS, diplomée de Pharmacie, est notre collaboratrice depuis près de deux années; elle nous a grandement aidé à réaliser ces expériences. Nous voulons la remercier ainsi que Monsieur M. DELEMEN, diplomé de Pharmacie, qui nous a assisté dans nos travaux.

INTRODUCTION

Les progrès rapides de la biochimie, accomplis durant les dernières années, dans le domaine de la synthèse protéique et des relations entre le génome et le métabolisme cellulaire ont profondément éclairé le problème de la croissance. Le rôle de l'acide ribonucléique (ARN) y est apparu primordial. Les différents types d'ARN connus interviennent spécifiquement au cours des diverses étapes de la synthèse protéique et gouvernent donc la formation tant des enzymes que des protéines de structure. La croissance, normale ou pathologique, correspond à un stade de synthèse protéique intense durant lequel le métabolisme des ARN est particulièrement important. Une revue récente de ces problèmes a été faite par J. BRACHET (1960). Ce sont les ARN qui dans une large mesure assurent le contrôle des croissances cellulaires.

Une autre propriété des tissus à proliférations rapide, embryonnaires ou cancéreux, qui synthétisent de grandes quantités d'ARN, est leur pauvreté en nicotinamide mononucleotide (NAD). Les cellules adultes saines contiennent plus de NAD et ont un métabolisme d'ARN bien plus réduit (MORTON, 1958). Le pouvoir de synthèse de NAD est diminué dans les organes en régénérations ainsi que dans les tumeurs; l'activité de la nicotinamide mononucléotide adénilyl transférase de KORNBERG est faible dans les tissus embryonnaires et dans les cellules cancéreuses (BRANSTER et COLL, 1956).

Nous nous sommes demandé s'il existait une relation directe entre la croissance et la biosynthèse des nucléotides à pyridine (NP) dans les conditions normales et pathologiques: par exemple un mécanisme régulateur qui orienterait la cellule soit vers la synthèse d'ARN soit vers celle du NAD. En effet l'adénosine triphosphate (ATP) qui provient du métabolisme énergétique est indispensable à la fois pour la formation du NAD et pour celle des nucléosides triphosphates précurseurs de l'ARN.

On pourrait objecter d'emblée que la disproportion entre les taux d'ARN et de NAD exclue l'hypothèse d'une interaction entre les biosynthèses de ces composés. Cependant il faut savoir que tout le NAD de la cellule est produit dans le noyau qui ne contient qu'une faible partie de l'ARN cellulaire mais dont l'importance dans les mécanismes de régulation n'est plus contestée.

Ceci nous a amené à rechercher si une augmentation de la synthèse de NAD par l'injection de nicotinamide (KAPLAN et COLL, 1956) pouvait modifier le

métabolisme de l'ARN. Nous avons ensuite étudié l'effet de la synthèse induite de NAD sur le phénomène d'hypertrophie rénale compensatrice (HCR) qui réalise une véritable croissance de cet organe.

Le noyau cellulaire est apparu comme le centre d'un équilibre ARN-NAD. Afin de poursuivre notre travail nous avons donc dû étudier le noyau principalement du point de vue de son métabolisme ribonucléique. Cette étude a été réalisée soit in vivo, soit in vitro avec des noyaux isolés. Les techniques modernes de la biologie moléculaire ont été mises en oeuvre pour cette investigation.

L'équilibre ARN-NAD semble avoir une signification importante dans la régulation de la croissance. La discussion de nos résultats nous amènera par conséquent à dégager les mécanismes biochimiques qui président à ce phénomène biologique capital.

METHODES ET TECHNIQUES

CHAPITRE I

ETUDES SUR LE REIN ENTIER

A. ANIMAUX D'EXPÉRIENCES

Toutes nos expériences ont porté sur des rats blancs élevés au laboratoire. La souche peut être considérée comme génétiquement homogène car les animaux sont constamment croisés entre frères et soeurs. Nous n'avons jamais constaté de diminution de la reproductivité. Les animaux sont très semblables entre eux ce qui permet de considérer qu'à l'intérieur d'une portée, la constitution des organes du lot témoin et du lot d'expérience est très voisine. Nous n'avons pas non plus observé de grandes variations d'une portée à l'autre, néanmoins chaque fois que cela était possible nous avons opéré sur une portée entière.

Nous avons utilisé des animaux agés de 4 à 6 mois. Ils sont adultes et ont atteint un poids de 150 à 250 g. La grosse majorité de nos expériences a porté sur des mâles. Les quelques essais effectués sur des femelles n'ont pas donné de résultats significativement différents.

Les rats sont nourris au "Ratigène", de l'Alimentation Equilibrée, enrichi deux fois par semaine par des vitamines. Voici la composition du Ratigène:

Protides	20,9
Lipides	4,2
Amidon	46,2
Matières minérales totales	8,0
Cellulose	4,3

Le mélange vitaminique renferme par ml:

Vitamine A	2.500 U.I.
Vitamine B_1	1 mg
Vitamine B_2	0,75 mg
Vitamine PP (Nicotinamide)	2,5 mg
Vitamine B_6	1 mg
Panthénol	2 mg
Vitamine C	25 mg
Vitamine D_2	500 U.I.
Vitamine E	1 mg

L'eau est donnée ad libidum.

B. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

1. ADMINISTRATION DE LA NICOTINAMIDE

Nous avons utilisé l'amide nicotinique fabriquée par les laboratoires HOFMANN-LAROCHE. La vitamine est injectée par voie intrapéritonéale en solution dans du sérum physiologique, sous un volume de 0,4 ml environ. Les doses employées ont varié de 500 à 750 mg par kg de rat. Nous avons soit pratiqué une injection unique soit plusieurs administrations à 13 heures d'intervalle.

Les animaux supportent bien ce traitement. La nicotinamide provoque parfois un léger épanchement sanguin péritonéal au point d'injection. Dans chaque expérience nous avons veillé à ce que le lot des animaux traités soit aussi semblable que possible au lot des rats témoins.

2. ADMINISTRATION DU ^{32}P-PHOSPHATE

Le radiophosphate injecté à faibles doses permet l'étude du renouvellement et de la biosynthèse des acides nucléiques. L'isotope, préparé à partir du Soufre, nous a été fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique. La dose injectée est de 300 μc par 100 g de rat sous un volume de 0,2 ml de sérum physiologique. Nous avons pratiqué l'injection intramusculaire ou intrapéritonéale.

En plus de la détermination du $^{32}PO_4$ incorporé dans l'ARN, nous avons mesuré dans chaque expérience, pour les animaux traités par la nicotinamide et pour les témoins, l'activité spécifique du PO_4 acido-soluble de l'organe.

3. NEPHRECTOMIE.

Pour l'étude de l'hypertrophie rénale compensatrice (HRC), il est nécessaire de pratiquer une nephrectomie. Les rats sont endormis à l'ether, et l'anesthésie est prolongée grâce à un masque imbibé d'éther. Après l'incision des plans cutanés et musculaires, le long du bord externe des muscles vertébraux dans la région lombaire, le rein est dégagé de sa loge graisseuse et de la capsule surrénale. Une pince KOCHER est mise en place et le rein est immédiatement enlevé. On ligature le pédicule rénal et on suture la paroi en deux plans. Aucun incident opératoire n'est à redouter et le réveil est rapide.

Le prélèvement du rein restant, hypertrophié, est effectué à des délais variables après la nephrectomie, mais selon le même mode opératoire, sous anesthésie et après clampage du pédicule rénal. Ce procédé est indispensable pour réduire au minimum les différences pouvant être attribuées à l'acte opératoire. Elle permet une comparaison plus rigoureuse entre le rein prélevé et le rein hypertrophié.

Lorsque nous avons étudié l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN au cours de l'HRC, il n'a pas été possible de comparer les deux reins du même animal; c'est alors avec un rat témoin, de la même portée, que nous avons effectué la comparaison. Le radiophosphate est administré 2 heures après la nephrectomie pour permettre à l'animal de revenir à un état physiologique normal. Pour les rats traités par la nicotinamide, la première injection de la vitamine est faite également 2 heures après la nephrectomie.

C. DOSAGES BIOCHIMIQUES

I. DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

a) ISOLEMENT

Sauf pour l'étude de l'HRC, les reins sont prélevés après décapitation du rat, réfrigérés, pesés puis analysés. L'isolement et le dosage des acides nucléiques est réalisé selon une technique que nous avons contribué à mettre au point dans ce laboratoire et qui comporte trois stades.

1 - Elimination des composés acido-solubles par l'acide trichloracétique à 7 p. cent ou par l'acide perchlorique à 6 p. cent, à 0°C (environ 3 ml d'acide pour 1 g de tissu). On centrifuge et on procède à une deuxième extraction par l'acide. Dans la fraction acido-soluble on peut mesurer les nucléotides libres, et notamment le NAD, et précipiter les ions PO_4 minéraux en vue de la détermination de leur radioactivité (voir plus bas). Le résidu acido-insoluble est lavé par de l'acide plus dilué puis par de l'eau glacée.

2 - Extraction des lipides par trois traitements à l'alcool, à température ordinaire, puis trois traitements par l'alcool bouillant et enfin deux lavages à l'éther bouillant. Le résidu est séché puis pesé; il renferme les protides, l'ARN et l'ADN. Les acides nucléiques représentent à peine 1 p. cent du poids de cette poudre, la mesure du résidu après le traitement de BLOOR que nous venons de décrire peut donc servir de mesure de la quantité de protides du tissu. C'est ainsi que nous avons déterminé les variations de la masse protéique du rein.

3 - Enfin séparation de l'ARN de l'ADN par la méthode de SCHMIDT et TANNHAUSER (1945). Le résidu est hydrolisé par la KOH N/2 à 37°C, pendant 16 heures environ. Pour 100 mg de résidu nucléoprotéique, provenant de 0,6 g de rein frais, et contenant à peu près 0,18 mg de P ribonucléique, on utilise 5 ml de KOH N/2. L'acide ribonucléique est hydrolysé en un mélange de nucléosides 2 - et - 3 - phosphate acido-solubles alors que l'ADN et les protéines restent acido-insoluble. On peut donc séparer les ribonucléotides et l'ADN en ajoutant à l'hydrolysat alcalin 0,14 volumes d'acides perchlorique concentré.

b) DOSAGES

Le dosage de l'ADN est fait sur la fraction acido-insoluble de l'hydrolysat de SCHMIDT et TANNHAUSER. Celle-ci est traitée par l'acide perchlorique N à 90°C pendant 30 minutes ce qui achève l'hydrolyse de l'ADN. Les désoxyribonucléotides sont alors dosés par la méthode de DISCHE (1930) (voir plus bas).

La fraction acido-soluble de l'hydrolysat alcalin ne contient pas que des ribonucléotides. Si on fait le dosage du phosphore par la méthode de MACHEBOEUF et DELSAL (1943) (voir plus bas), le dosage du ribose par la méthode de de MEJBAUM (1939) et celui des bases par la mesure de l'absorption dans l'UV, la correspondance entre ces trois valeurs qui devrait être parfaite n'est pas réalisée. Cette fraction est en effet contaminée par la présence de composés phosphorés non nucléotidiques: phosphatidopeptides et PO_4 provenant de l'hydrolyse des phosphoprotéines (LEDIG et COLL. 1961). Pour la détermination de l'activité spécifique de l'ARN il est nécessaire de se débarasser de ces composés. Nous avons utilisé une technique de purification des ribonucléotides sur charbon (WEILL, 1958).

c) PURIFICATION DE L'ARN HYDROLYSE SUR COLONNES DE CHARBON

Le charbon retient les composés cycliques désaturés tels que les hétérocycles puriques ou pyrimidiques. Les nucléotides seront donc adsorbés et les composés non nucléotidiques passeront dans l'effluat de la colonne.

Le charbon employé doit posséder deux qualités: retenir tous les nucléotides et les abandonner ensuite quantitativement au cours de l'élution. Les charbons du commerce, tel que l'ACTIVIT, doivent être activés par ébullition dans l'acide acétique sans quoi l'absorption n'est pas totale. Mais ensuite celle-ci est trop énergique et l'élution n'est plus satisfaisante. Il faut donc se défaire des particules de charbon les plus actives; on utilise le phénol qui se fixe sur ces particules et les empêche ainsi de capter les nucléotides.

Pratiquement: 100 g de charbon (ACTIVIT XL 50) sont traités par 2 litres d'acide acétique bouillant (à 50 p. cent) pendant 5 minutes, puis lavés jusqu'à neutralité et ensuite traités par 2 litres d'une solution de phénol à 5 p. cent pendant 10 minutes. On lave abondamment et on sèche à l'étuve. Pour chaque purification de nucléotides on utilise environ 500mg de charbon; ceci correspond à 100 mg de charbon pour 100 μg de phosphore de l'hydrolysat alcalin. Pour améliorer le débit de la colonne qui fait environ 2 cm de diamètre on mélange au charbon un volume égal de Célite (broyat de foraminifères fossiles). Il est indispensable de neutraliser la fraction acide soluble de l'hydrolysat alcalin avant de la jeter sur la colonne; en utilisant la KOH on peut se débarasser des ions perchlorates qui précipitent au froid.

On fait passer la solution de nucléotides sur la colonne puis on lave avec un égal volume d'eau. Effluant et eaux de lavages renferment le Phosphore non nucléique. L'élution se fait avec un mélange alcool-ammoniaque-eau (50/20/30 en volumes). Il faut faire passer 100 ml pour obtenir une élution complète. Le liquide d'élution est évaporé sur un bain marie bouillant puis les nucléotides sont remis en solution dans le HCl N/100. Les déterminations de Phosphore de ribose et de bases sont faites: la correspondance doit être alors satisfaisante. Sur le même échantillon on détermine la radioactivité au compteur cloche de GEIGER-MULLER avec une fenêtre en mica (1,8 mg/cm^2).

TABLEAU 1

PURIFICATION DES RIBONUCLEOTIDES SUR CHARBON

Exp. N°	Hydrolyses de Schmid et Tannhauser		Effluant de la colonne de Charbon	Eluat		E	%
	Phosphore* a	Ribose* b	Phosphore* c	Phosphore* d	Ribose*	c + d	$\frac{c+d}{a}$
I	18,6	10	7,35	11,4	9,9	18,8	104
II	18,6	12,1	7,0	12,8	11,7	19,8	105
III	19,2	11,0	6,5	11,5	11,1	18	96

* Valeurs en µmoles de nucleotides pour 1 g rein.

Le tableau I donne quelques exemples de purification sur colonne de charbon. La récupération des ribonucléotides du rein est quantitative, comme le montre le dosage du ribose. La correspondance entre ribose et phosphore dans l'ARN purifié est bonne et la détermination de la radioactivité peut donc se faire correctement.

d) TECHNIQUES ANALYTIQUES

Mesure de l'absorption dans l'ultra-violet

Les bases puriques et pyridimiques qui entrent dans la composition de l'ARN et de l'ADN absorbent dans l'UV et présentent des maximum aux environs de 2.600 Å. Après dilution convenable de la fraction acido-soluble de l'hydrolysat alcalin ou de la solution des nucléotides purifiés sur la colonne de charbon, on détermine la valeur de l'absorption à cette longueur d'onde sur un spectrophotomètre UNICAMP SP 500 ou JOBIN-YVON. Dans nos conditions de mesure une unité de densité optique (D.O.) correspond à 2,8 μg de P nucléique (ou 0,090 μM de nucléotide).

La détermination de la quantité d'ARN par cette méthode n'est pas rigoureusement exacte: les acides aminés à hétérocycles présents dans la fraction acido-soluble de l'hydrolysat alcalin absorbent dans l'UV. Après purification sur charbon ils se trouvent encore dans l'éluat avec les nucléotides. Il faudrait donc utiliser un facteur de correction. Celui-ci a été calculé pour la levure par TSANEV et MARKOV (1960), cependant nous n'avons pas employé ce procédé, les différences étant minimes dans conditions.

Dosage du phosphore: Méthode de Macheboeuf et Delsal (1943)

Cette méthode qui trouve ses sources dans BELL-DOISY (1920) et dans BRIGGS (1922) s'applique lorsque la quantité de phosphore dans la prise est de l'ordre de 20 à 80 μg. L'échantillon est minéralisé dans de petits matras en présence de 0,3 ml de SO_4H_2 concentré et de quelques ml de NO_3H. Après une heure environ il ne reste que de l'acide sulfurique incolore. Nous ajoutons un peu d'eau et hydrolysons les pyrophosphates éventuellement formés. Nous complétons à 8ml et ajoutons dans l'ordre: 2 ml de molybdate d'ammonium à 5 p. cent, 1 ml de sulfite de sodium à 20 p. cent et 1 ml d'une solution fraîchement préparée d'hydroquinone à 1 p. cent (contenant une goutte d'acide sulfurique pour 100 ml). Après 20 min. exactement nous lisons l'intensité de la coloration bleue (due à la réduction du phosphomolybdate) à 6.500 Å au COLEMANN JUNIOR dans un tube de 19 mm de diamètre. Une unité de D.O. correspond alors à 68 μg de P.

Le dosage du phosphore minéral peut se faire sans minéralisation: il convient d'ajouter 0,3 ml d'acide sulfurique, avant d'introduire les réactifs. Pour la mesure de la radioactivité du PO_4 minéral il faut isoler ce dernier. Nous introduisons dans un tube cônique 10 ml de mixture magnésienne ($MgCl_2$: 110 g; NH_4Cl: 100 g; NH_4OH conc. 200 ml et H_2O q.s.p. 1000 ml), 10 gouttes d'ammoniaque et une aliquote de la fraction acido-soluble du tissu. Il faut amorcer la précipitation en frottant la paroi du tube avec une baguette de verre. Après 48 heures de séjour à 0°C le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien est

séparé, lavé deux fois à l'eau ammoniacale à 5 p. cent et dissous dans l'HCl 3 N au bain Marie bouillant (15 min.). Le phosphore et la radioactivité sont alors déterminés.

Pour les faibles quantité de phosphore il est possible de rendre plus sensible la technique à l'hydroquinone grâce à la modification conseillée dans la méthode de BERENBLUM et CHAIN (1938). Vingt minutes après l'addition des réactifs décrits plus haut, une agitation de quelques secondes en présence de Butanol (3,5 ml) extrait toute la coloration. Nous décantons la couche de butanol qui surnage, grâce à une pipette, dans un tube de 12 mm de diamètre et effectuons la lecture à 6.800 Å. Dans nos conditions une unité de D.O. correspond à 28 µg de phosphore: on peut doser ainsi de 3 à 20 µg de P.

De nombreuses techniques utilisant l'acide ascorbique comme agent réducteur ont été publiées. Nous avons utilisé celle de CHEN, TORIBARA et WARNER (1956); elle est très fidèle et la silice n'interfère pas. L'échantillon est minéralisé en présence de 0,8 ml d'acide sulfurique 6 N et d'acide nitrique. On transvase dans un tube jaugé renfermant 4 ml de la solution de vitamine C fraîchement préparée (on mélange dans l'ordre 52 ml d'eau bidistillée, 8 ml d'acide sulfurique 6 N, 20 ml de molybdate à 2,5 p. cent, 20 ml d'acide ascorbique à 10 p. cent; la solution d'acide ascorbique se conserve une semaine à 0°C, mais le réactif complet n'est stable que 1/2 heure), et on complète à 8 ml. Après 1 heure à l'étuve à 37°C (les tubes étant bouchés) la coloration s'est développée. Elle reste stable pendant 24 heures; la lecture se fait à 6.800 A. Avec des tubes de 19 mm de diamètre une unité de D.O. correspond à 17,3µg de P. On peut ainsi doser de 1 à 15 µg de P.

Dosage du ribose: Méthode de Mejbaum (1939)

Ce dosage est très important car il permet dans la fraction acido-soluble de l'hydrolysat alcalin de déterminer la quantité totale d'ARN, malgré la présence des impuretés déjà signalées. Bien que le rendement de la colonne de charbon soit très bon, nous avons tenu compte de la valeur du ribose, dans l'hydrolysat avant purification, pour le calcul de la teneur de l'organe en ARN.

La technique de dosage comporte les phases suivantes:

- à 3 ml de solution à doser on ajoute 3 ml de réactif à l'orcine; celui-ci est préparé extemporanément de la façon suivante:
  1 g d'orcine (MERCK) dans 100 ml d'une solution de $FeCl_3$ diluée (solution concentrée de perchlorure de fer: 2 ml de $FeCl_3$ concentré dans 20 ml d'HCl concentré. Solution de perchlorure de fer diluée: 3,3 ml de la solution précédente dans 100 ml de HCl concentré).
- on place les tubes 20 minutes au bain-marie bouillant, on dilue avec 6 ml d'eau (bouillante) et la coloration est mesurée à 6.600 Å au Coleman Junior dans les tubes de 19 mm de diamètre.
- une unité de densité optique correspond alors à 0,355 micromoles de ribose dans le cas des mononucléotides puriques, soit 11 µg de P nucleotiques.

Pour l'ARN le problème est légèrement plus complexe; seuls les riboses provenant des nucléotides puriques sont dosés quantitativement, les nucléotides pyrimidiques ne sont dosés que très faiblement. Les résultats du dosage dépendront

donc de la proportion des puriques sur les pyrimidiques et varieront d'un type d'ARN à l'autre. Il faut faire une courbe pour chaque tissu; le facteur que nous avons employé était: 1 U.D.O. = 0,84 μM de nucléotides ribonucléique (soit 26 μg de P nucléotique). Pour rendre le dosage plus sensible on peut s'abstenir de diluer les 6 ml initiaux. L'arrêt de la réaction se fera alors en refroidissant les tubes. La lecture est faite à la même longueur d'onde mais dans des tubes quadrangulaires. A une U.D.O. correspond 0,41 micromoles de nucléotides (soit 12,7 μg de P nucléotidique).

Dosage du désoxyribose: Méthode de Dische (1930)

Il se fait sur la fraction acido-insoluble de l'hydrolysat alcalin après extraction par l'acide perchlorique N à 90°C pendant 30 minutes. Aux 4 ml de la prise d'essai on ajoute 8 ml de réactif à la diphénylamine (1g de diphénylamine; 2 ml d'acide sulfurique concentré que l'on ajoute après avoir dissous le produit dans 100 ml d'acide acétique glacial). Les tubes munis d'un réfrigérant sont placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Il se développe une coloration bleu-violet qui, après refroidissement, devient bleu limpide. Après trois heures à l'obscurité, on effectue la mesure à 6.000 Å. Une unité de D.O. (dans les tubes de 19 mm) correspond à 124 μg de P désoxyribonucléique.

e) EXPRESSION DES RESULTATS

La quantité d'ARN est calculée à partir de la valeur du ribose et exprimée en micromoles de nucleotides (parfois abrégé en μM). l'activité spécifique de l'ARN est le rapport:

$$\frac{\text{nombre de coups par minute au compteur GEIGER-MULLER}}{\text{nombre de micromoles de nucléotides}} = \text{A.S. ARN}$$

c'est donc l'activité incorporée par microatome de phosphore nucléique. L'activité absolue est la radioactivité incorporée dans l'ensemble du phosphore nucléique d'un rein ou d'un gramme de tissu rénal; on calcule en multipliant l'A.S. par la quantité de P exprimée en microatomes.

Le plus souvent nous avons utilisé l'activité spécifique relative (A.S.R.) c'est-à-dire le rapport de l'A.S. de l'ARN à l'A.S. du PO_4 minéral du même tissu. Ceci permet de tenir compte des différences éventuelles entre les lots d'animaux quant à la vitesse de résorption et d'élimination du $^{32}PO_4$.

Comme nous l'avons déjà signalé, la quantité de protéines rénales est déterminée en pesant la poudre obtenue après le traitement de BLOOR. On peut considérer que 99 p. cent de cette préparation est formé par les protides.

2. DOSAGE DES NUCLEOTIDES A PYRIDINE

a) DOSAGE FLUOROMETRIQUE

Nous avons utilisé la technique de LOWRY et COLL (1957). Cette méthode repose sur la formation d'un produit fluorescent stable par l'action de la soude ou de la potasse 6N sur le NAD (KAPLAN et COLL, 1951). Le dosage de LOWRY permet de doser les quatre formes de coenzymes à pyridique (NAD, $NADH_2$, NADP, $NADPH_2$) en tirant profit de la stabilité des nucléotides oxydés en milieu acide alors que les nucléotides réduits y sont détruits. Nous avons dosé les coenzymes à «pyridine» dans la fraction acido-soluble du tissu; dans ces conditions le NAD et le NADP seront mesurés à la fois, mais par leurs formes réduites.

La réaction se fait dans de petits tubes de verre de 8 mm de diamètre et d'une contenance de 3 ml. D'abord, 0,25 ml de la solution acide, contenant de 5 à 20 µg de NAD (10^{-8} M environ) sont introduits dans les tubes. On ajoute 0,26 ml de NaOH 12 N et on agite. Il est nécessaire de faire un témoin : 0,26 ml d'eau + 0,25 ml de NaOH 12 N. Les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant 30 min. puis on dilue en ajoutant 2 ml d'eau. La lecture est faite au fluoromètre Farrand Modèle A, avec les filtres Farrand et C° suivants: I : 5860 (7-37); II : 4308 (4-70) + 5562 (5-61) + 3387 (3-72). La longueur d'onde d'excitation est alors de 3600 Å (avec une transmission de 35 p. cent) et la longueur d'onde de réception est de 4700 Å (avec 46 p. cent). Dans ces conditions le témoin donne une lecture nulle. On se sert d'une solution fluorescente standard pour étalonner l'appareil; nous avons employé une solution de quinine pure dans le SO_4H_2 N/10 (1 µg de quinine par ml). Les lectures sont obtenues en pourcentage de la fluorescence du standard. Dans nos conditions, la fluorescence de la solution de quinine correspondait à 24 µg deNAD.

La fluorescence produite est stable à condition d'avoir dilué la soude à la fin de la réaction, sinon elle est partiellement détruite par la lumière U.V. Bien que l'on dose à la fois le NAD et le NADP les résultats ont été exprimés en µg de NAD.

b) DOSAGE ENZYMATIQUE

Ce dosage qui a été décrit par CIOTTI et KAPLAN (1957) repose sur la réduction du NAD en $NADH_2$ par l'alcool deshydrogénase en présence d'alcool. Il est plus spécifique du coenzyme I, mais moins sensible. Le $NADH_2$ formé est mesuré par son absorption dans l'U.V. à 3400 Å.

Voici le mode opératoire :

- la réaction est effectuée dans une solution alcool-pyrophosphate de Na (4,46 g de $P_2O_7Na_2$, 10 H_2O + 2,9 ml alcool absolu = H_2O q.s.p. 100 ml).
- dans les cuves en quartz du spectrophotomètre JOBIN-YVON on introduit 0,5 ml de la solution de NAD neutralisée(soit de 25 à 250 µg de NAD). On ajoute 2,5 ml de la solution alcool-pyrophosphate et on détermine l'absorption à 3400 Å. On introduit alors à l'aide d'une petite spatule de verre 10 µg d'alcool deshydrogénase (0,01 ml). Au bout de trois minutes l'absorption dans l'U.V. est à nouveau mesurée à la même longueur d'onde. La différence est dûe à l'apparition du $NADH_2$et éventuellement à l'absorption propre de l'enzyme. Il faut donc faire un témoin contenant de l'eau et traité de la même manière. Dans nos conditions, une unité de D.O. correspond à 360 µg de NAD. Le coefficient d'extinction millimolaire de NADH est de $6,2.10^3$ pour une cuve de 1 cm.

c) DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE : MESURE DE E_{260}

L'apparition des coenzymes à pyridine après l'injection de nicotinamide peut être suivie par la mesure de l'absorption dans l'UV de la fraction acido-soluble du tissu. La détermination se fait à 2600 Å et on repère ainsi les nucléotides adényliques néoformés (KAPLAN et COLL, 1956).

L'acido-soluble est dilué 10 fois environ, mais la lecture se fait en pH acide.

CHAPITRE II

ÉTUDES SUBCELLULAIRES

A. *FRACTIONNEMENT CELLULAIRE*

C'est avant tout l'étude du noyau que nous voulions entreprendre. Nous avons donc choisi une méthode de préparation des noyaux plutôt qu'une technique de fractionnement de la cellule.

Les problèmes que pose l'isolement des noyaux sont nombreux: il faut non seulement obtenir une fraction pure de toute contamination cytoplasmique, mais encore intacte du point de vue morphologique et qui plus est du point de vue biochimique. Les noyaux, plus lourds que le reste des organites cellulaires, peuvent être préparés par ultracentrifugation. La difficulté est de trouver le milieu dans lequel opérer cette centrifugation.

L'acide citrique (DOUNCE, 1943) ou les solutions salines sont à rejeter : ils donnent des préparations contaminées et extraient partiellement les protéines nucléaires (HOGEBOOM et SCHNEIDER, 1955). Les solvants non acqueux (BEHRENS, 1932; SIEBERT et COLL, 1961) semblent très satisfaisants: ils permettent d'opérer sur un tissu qui a été congelé dès son prélèvement, puis lyophylisé. Du point de vue théorique ils sont donc plus adéquats, mais leur application est complexe. De plus, une partie des nucléoprotéines sont dénaturées et tous les lipides sont extraits. La séparation se faisant dans une marge de densité très faible, on n'est pas sûr d'avoir un échantillonage de tous les noyaux du tissu. Nous n'avons donc pas adopté cette méthode.

Les solutions de saccharose iso- et hypertoniques ont été utilisées. Nous avons choisi la méthode de CHAUVEAU (CHAUVEAU et COLL, 1957) qui est bien meilleure que celle de HOGEBOOM et COLL (1952) ou celle de DE DUVE (1955) car la contamination cytoplasmique est réduite au minimum. Les solutions de saccharose ne modifient pas la composition nucléaire. La méthode de CHAUVEAU utilise une solution de saccharose fortement hypertonique (2,2 M). Ce milieu possède une densité (1,28) intermédiaire entre celle des noyaux (1,4) et celle des cellules entières (1,1 - 1,25). La centrifugation, 1 heure à 40.000 g, dépose les noyaux alors que les éléments cytoplasmiques se rassemblent à la surface. Nous n'avons que légèrement modifié cette technique originale pour l'appliquer à notre tissu.

Du point de vue pratique nous opérons de la manière suivante: Les reins sont rapidement prélevés et plongés dans une solution de saccharose 0,25 M à 0°C.

Après la pesée les reins sont broyés dans du saccharose M. On utilise pour ce broyage, comme WEILL (1958) le conseille, l'appareil POTTER de la A.THOMAS Co (Philadelphie) à cylindre en pyrex et à piston en Teflon. Le cylindre est constamment plongé dans la glace et le piston tourne à 600 tours/minute pour éviter l'échauffement. Nous employons environ 3 ml de saccharose M pour un g de tissu rénal; 2-3 aller-retour du piston sont nécessaires. L'homogénat ainsi réalisé est transféré dans un homogénéiseur de type CHAUVEAU en plexiglas. On ajoute 5,6 volumes de saccharose 2,42 M (0,825 g/ml) et on broie par 3 à 5 aller-retour du piston. Il est bon de suivre au microscope la destruction des tubes rénaux et l'intégrité des noyaux. L'homogénat concentré est alors centrifugé 60 minutes à 25.000 tours/minute dans un ultracentrifugeur Spinco modèle L à 0°C.

Les noyaux forment un culot assez large, remontant le long de la paroi du tube, mais incolore et gélatineux. Un examen microscopique est pratiqué. Les noyaux ne sont pas lavés, dans une solution diluée de saccharose, de peur d'extraire une substance nucléaire. La grande qualité de cette technique est en effet, outre sa simplicité et sa rapidité, le fait que dans une solution fortement hypertonique on diminue les riques d'une migration des solutés vers le milieu extérieur.

B. MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT NUCLÉAIRE

Dans la partie consacrée à nos "RECHERCHES et RESULTATS" nous discutons les diverses méthodes qui ont été employées. Ici nous ne ferons que présenter les détails techniques de notre procédé de fractionnement nucléaire.

1. METHODE AU PHENOL

Les noyaux provenant de 8 à 10 g de tissu rénal sont repris dans 15 ml de NaCl 0,14 M et broyés dans un appareil type "VITRIS" à 30.000 tours/minute pendant 15 min. On ajoute ensuite 15 ml de phénol pH 6,0, saturé en eau, et on homogénéise à 15.000 tours/min. On centrifuge et on sépare le surnageant: fraction NS-RNA. L'interphase est reprise dans le NaCl 0,14 M et on ajoute un volume égal de phénol saturé en eau et amené à pH 8,3 par la potasse. On homogénéise 5 minutes à 15.000 t/m, on centrifuge et on sépare le surnageant: N-RNA-E de l'interphase N-RNA-NE. L'ARN des deux fractions surnageantes est précipité par 2 volumes d'alcool. L'interphase est traitée à l'alcool et à l'éther éthylique pour éliminer le phénol, puis au NaCl 10 p. cent (pendant 1 heure à 100°C) qui extrait l'ARN. Celui-ci est alors précipité par 2 volumes d'alcool. Les ARN ainsi obtenus sont soumis au traitement de BLOOR (voir plus haut) et au dosage selon SCHMIDT et TANNHAUSER.

2. METHODE D'ALLFREY ET MIRSKY

C'est une méthode modifiée que nous avons utilisée. Les noyaux de 10 g de tissu rénal environ sont repris dans 5 ml de tampon Tris pH 7,6; 0,01 M et homogénéisé dans un appareil Thomas et Co (voir plus haut) en présence de 1 ml de bentonite à 2,5 p. cent. Dans cette solution hypotonique, les noyaux sont lysés.

On laisse reposer au froid pendant 15 min. On ajoute alors 5 ml de tampon Tris pH 7,6; 1 M - $CaCl_2$ 0,006 M. On homogénéise par 5 aller-retour du piston, on laisse reposer pendant 10 min. et on reprend une deuxième fois le même traitement. La suspension obtenue est alors centrifugée (1.000 g, 15 min.). Le surnageant contient le "suc nucléaire". Celui-ci est centrifugé 15 min. à 15.000 g pour séparer les débris nucléaires. Le suc nucléaire est alors soumis à une ultracentrifugation à 105.000 g pendant 90 min.: on dépose les " ribosomes nucléaires" et il reste une fraction "surnageante nucléaire".

Le reste des noyaux obtenus après le traitement par le tampon neutre est repris dans le NaCl M (10 ml) et agité dans cette solution pendant une nuit à 0°C. On centrifuge pendant 15 min. à 40.000 g et on sépare dans le surnageant une "fraction chromosomique" contenant l'ADN et un peu d'ARN ("ARN-ADN") et dans le culot on retrouve les nucléoles. Ces derniers sont repris dans 8 ml de tampon phosphate pH 6,85; 0,05 M et homogénéisé dans cette solution. On ajoute un volume égal de Phénol à 90 p. cent (contenant 0,1 p. cent d'hydroxyquinoléine) et on agite pendant 60 min. à température ordinaire. On peut alors par la centrifugation séparer une phase aqueuse (nucléolaire I) et une interphase (nucléolaire II). Ces deux fractions sont lavées à l'éther qui est ensuite éliminé par évaporation.

Toutes les fractions nucléaires obtenues sont traitées par l'acide perchlorique (concentration finale 0,6 N) et les ARN et les protéines qu'ils contiennent sont précipités. Pour éviter la purification sur charbon de l'ARN, qui sur d'aussi petites quantités serait délicate, nous avons soumis les fractions subnucléaires à un traitement par le méthanol-chloroforme-HCl qui permet d'extraire les phosphoprotéiques et les phophatidopeptides avant l'hydrolyse alcalin (LEBARON et FOLCH, 1956). Voici comment nous opérons:

- 2 traitements au ClO_4H 0,6 N à 0°C
- 2 traitements au ClO_4H 0,2 N à 0°C
- 1 traitement à l'acétone
- 2 traitements au CH_3OH-$HCCl_3$-HCl (1ml d'HCl concentré dans 300 ml d'un mélange méthanol-chloroforme : 1/2, V/V)
- 1 traitement à l'acétone
- sècher et hydrolyser par la KOH N/2 pendant 60 min. à 37°C.

Le reste des dosages est fait comme nous l'avons déjà décrit.

Les radioactivités sont lues dans un compteur à scintillation Packard.

C. *TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE FRACTIONNEMENT DE L'ARN*

Les fractions nucléaires obtenues par les méthodes que nous venons de décrire peuvent n'être que des artéfacts ou bien contenir encore plusieurs types d'ARN. Il fallait donc les confronter avec des techniques qui permettent la séparation des diverses sortes d'ARN selon leur propriétés physico-chimiques. Ces méthodes s'appliquent aux préparations d'ARN, du noyau ou d'une fraction cellulaire, à condition de les obtenir avec le moins possible de dégradation. Il nous faut donc commencer par décrire la technique d'isolement de l'ARN.

1. PREPARATION DE L'ARN NUCLEAIRE

Les noyaux provenant de 10 g de tissu rénal, sont repris dans 3 ml d'un tampon A (Tris-HCl pH 7,3 0,01 M-CH_3COO Mg 0,001 M) en présence de 1 ml de bentonite (BROWNHILL, 1959) à 2,5 p. cent et de 110 mg de dodécyl sulfate de sodium. On agite 10 min. à 0°C pour obtenir la lyse. On ajoute alors 6 ml de tampon A, 1 ml de bentonite et 10 ml de phénol à 90 p. cent, contenant de l'hydroxy-8-quinoléine (0,1 p. cent). On agite 30 min. à la température ordinaire. La centrifugation fournit une phase aqueuse à laquelle on ajoute de NaCl (concentration finale 0,1 M) et deux volumes d'alcool (le pH est amené à 5 avec quelques gouttes d'acide acétique dilué). On laisse les acides nucléiques précipiter une nuit à -18°C.

Les noyaux contenant dix fois plus d'ADN que d'ARN il est indispensable de se débarasser de cet ADN par un traitement à la DNase.

Les acides nucléiques sont repris dans 3,5 ml d'un tampon Tri-acétate pH 7,4, 0,01 M - CH_3COOMg 0,0001 M avec 1 ml de bentonite 2,5 p. cent. Pour permettre au précipité de mieux se dissoudre on homogénéise dans un appareil de Potter en verre. A la solution, on ajoute 0,3 ml d'un tampon Tris-acétate pH 7,4; CH_3COOMg 0,1 M et la DNase. Nous avons disposé d'une préparation enzymatique qui était assez peu active mais qui ne contenait pas de RNase. Nous avons utilisé environ 100 µg par ml et incubé à 37°C pendant deux heures. (La bentonite inhibe l'action DNasique, ce qui explique aussi les fortes doses nécessaires). Cependant la plupart des DNases du commerce sont contaminées par la RNase et il est alors nécessaire de réduire la dose d'enzyme employée et de ramener l'incubation à 15 min. à 25°C. En effet même la bentonite n'est pas capable d'inhiber la RNase contaminante si celle-ci est trop abondante. Après l'incubation le pH est amené à 5,5 avec CH_3COOH dilué. On centrifuge alors 15 min. à 25.000 g pour déposer la bentonite. Le surnageant est rendu 0,1 M en NaCl et l'ARN est précipité par 2 volumes d'alcool pendant la nuit à -18°C, en présence d'acétate de K à 2 p. cent.

Les dosages effectués sur cette préparation montrent qu'elle ne contient pas de protéines ni d'ADN acido-insoluble. Néanmoins l'alcool précipite certains oligodesoxyribonucléotides acido-solubles.

2. CHROMATOGRAPHIE SUR ALBUMINE METHYLEE-KIESELGUHR

Nous n'avons pas utilisé la technique originale de MANDELL et HERSHEY (1960) mais une méthode modifiée que nous avons apprise chez le docteur F. GROS à l'Institut Pasteur à Paris. Nous le remercions très vivement ici.

L'albumine méthylée est préparée à partir de l'albumine du sérum de bovidé (Fraction V, Nutritional Biochemical Co). Environ 5 g de la protéine sont mis en suspension dans 500 ml de CH_3OH redistillé. On ajoute 4,2 ml de HCl concentré, ce qui provoque la dissolution de l'albumine dans le méthanol. On laisse reposer pendant 4 à 5 jours à l'obscurité en agitant 2 à 3 fois par jour. Au bout de ce laps de temps, si la méthylation a réussi, la solution est redevenu laiteuse. On centrifuge, le culot est lavé au méthanol puis à l'éther éthylique et on sèche sans chauffer dans un dessicateur. Extemporanément on prépare une solution à 1 p. cent dans l'eau.

La colonne que nous avons employée avait un diamètre de 2 cm. Dix g de Hiflo-super Cel (Kieselguhr) sont mélangés avec 50 ml d'un tampon Tris pH 7, 0,02 M - NaCl 0,1 M. On porte à ébullition pour chasser l'air, on refroidit et on ajoute 5 ml de la solution d'albumine méthylée. La suspension est mise sur la colonne et tassée sous 0,25 g/cm² de pression. Une petite couche de kieselguhr sans albumine est placée au sommet de la colonne. Il est nécessaire de laver la colonne avant l'emploi avec 200 ml du tampon ci-dessus. L'ARN dissous dans 10 ml du même tampon est adsorbé sur la colonne. On lave abondamment pour éliminer les oligodesoxyribonucléotides.

L'élution est réalisée en gradient exponentiel avec une solution-tampon Tris pH 9,7, 0,02 M - NaCl 1 M. Le ballon mélangeur est au départ plein de la solution saline diluée à pH neutre indiquée plus haut. Il a une contenance de 540 ml. Des fractions de 6 ml sont recueillies. On détermine l'absorption dans l'UV à 2.600 Å. Les tubes sont réunis deux à deux, en fractions de 12 ml, pour mesurer la radioactivité dans le cas où un isotope, ^{32}P ou ^{14}C, a été incorporé dans l'ARN. On ajoute alors 2 ml d'une solution d'albumine à 1 p. cent et 1 ml d'acide perchlorique concentré. Le précipité est recueilli par centrifugation et dissous dans l'hyamine. La radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation Packard.

Les valeurs de l'absorption dans l'UV et de la radioactivité de chaque fraction sont portées sur un diagramme. Nous avons pû vérifier qu'après action de la RNase, toute la radioactivité et l'absorption dans l'UV inscrits sur la diagramme ont disparu.

3. ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCAROSE.

Nous avons utilisé la technique de GROS et COLL (1961) tant pour l'étude de l'ARN purifié que pour celle des particules ribonucléoprotéiques. Aucune modification n'a été apportée aux procédés de ces auteurs, en ce qui concerne la sédimentation des ribosomes. Pour l'ARN au contraire nous avons utilisé un gradient de saccharose de 12,5 à 30 p. cent. La centrifugation est faite alors dans le rotor Spinco SW 39 à 37.000 tours/min. pendant 14 heures (CHENG, 1961).

D. ÉTUDES IN VITRO SUR LES NOYAUX ISOLÉS

1. CONDITIONS D'INCUBATION

Les noyaux provenant de 10 g de tissu rénal sont repris dans 4 ml d'une solution de saccharose 0,25 M. Ils sont incubés dans le milieu décrit par LOGAN et qui a la composition suivante (1957) :

Solution I :	pour 100 ml	Glucose	1,8 g
		NaCl	0,625 g
		$MgCl_2$	0,534 g
Solution II :	pour 100 ml	$PO_4HNa_212H_2O$	2,506 g
		$PO_4H_2Na\ H_2O$	0,414 g
		Saccharose	8,55 g

On prend 0,5 ml de chaque solution et 1 ml de noyaux dans le saccharose 0,25 M. Les noyaux résistent à une incubation de 30 min. dans ce milieu sans modifications morphologiques profondes.

Les produits radioactifs sont ajoutés sous un très faible volume. On introduit soit 6 µc d'adénine-8- C soit 10 µc d'acide orotique-6- C (activité spécifique 2mC/mM).

Pour l'étude de la corrélation ARN-NAD on ajoute :

6 µM de Nicotinamide mononucléotide (SIGMA)....	2 mg
10 µM d'Adénosine triphosphate (ATP, SIGMA).....	5,07 mg
1,4 mM de Nicotinamide (HOFMANN-LAROCHE)..	171 mg
17 µM de $MgCl_2$	3,4 mg

pour une incubation de 2 ml (vol. final)

Dans l'incubation témoin on supprime simplement le NMN.

En général nous avons incubé pendant 15 min. à 37°C. L'incubation est stoppée avec l'acide perchlorique à -10°C. Une des incubation est traitée par par l'acide dès le début de l'expérience et sert de zéro. De la bentonite (BROWNHILL, 1959) a parfois été ajouté dans 0,3 ml.

2. FRACTIONNEMENT DES NOYAUX.

Lorsque le dosage des acides nucléiques n'est pas fait sur l'ensemble des des noyaux et du milieu d'incubation on perd une certaine fraction de l'acide nucléique qui, au cours de l'incubation, migre vers le milieu extérieur. Après traitement par l'acide, l'incubation est centrifugée, le surnageant servant au dosage des substances acido-solubles et le culot à celui des acides nucléiques.

Dans certaines expériences nous avons fractionné les noyaux selon la méthode décrite dans le paragraphe B de ce chapitre. Les noyaux sont d'abord séparés du milieu d'incubation par centrifugation et on recueille ainsi la fraction So. Les noyaux sont alors repris dans le tampon Tris hypotonique pour la lyse et les opérations se succèdent comme cela a été indiqué.

3. DOSAGE DES COMPOSES ACIDO-SOLUBLES

Nous avons après chaque incubation dosé le NAD par la méthode enzymatique à l'alcool déshydrogénase dans la fraction acido-soluble.

Dans quelques expériences les nucléotides libres acido-solubles ont été séparés par chromatographie : soit sur colonne de Dowex-1x8 l'élution se faisant avec un gradient exponentiel de HCOOH et de $HCOONH_4$ (WEILL, 1958) soit sur papier Watmann 3 dans un solvant propanol ammoniaque eau (60/30/10; v/v/v) descendante pendant 36 heures. Les diverses fractions ont été récupérées, les nucléotides identifiés par leur spectre UV et la radioactivité déterminée.

APPENDICE

Nous avons utilisé dans le calcul de certaines valeurs des méthodes statistiques simples.

Pour évaluer la dispersion des résultats par rapport à la moyenne, nous avons effectué le calcul de la déviation standart selon la formule suivante :

$$s = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

où x = valeur expérimentale
$\bar{x}$ = moyenne des valeurs expérimentales
n = nombre d'expériences

La valeur de la déviation standart précédée du signe $\pm$ accompagne la moyenne.

RECHERCHES ET RÉSULTATS

CHAPITRE I

EXISTENCE D'UNE CORRELATION ARN-NAD

Nous décrirons successivement les étapes de ces recherches.

A. SYNTHÈSE DE NAD APRÈS INJECTION DE NICOTINAMIDE

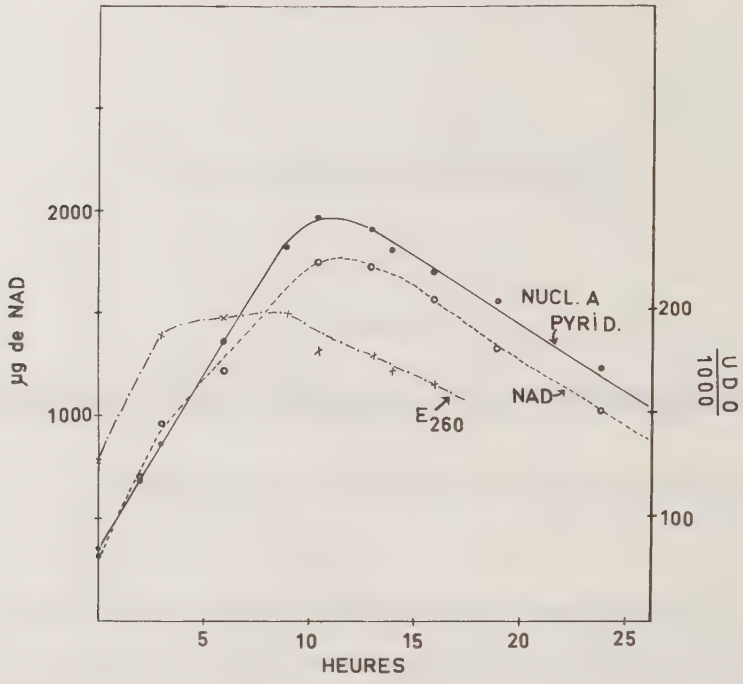
Bien que tous les mécanismes de la biosynthèse des nucléotides à pyridine ne soient pas encore connus, il est possible de provoquer par l'administration des précurseurs connus du NAD une importante formation de coenzymes à pyridine. Ce phénomène qui a été décrit par KAPLAN et COLL (1956) dans divers organes de la souris a pû être reproduit dans le rein du rat. La possibilité d'induire une synthèse de NAD offre un moyen de choix pour l'étude des corrélations NAD-ARN. Notre travail a donc consisté d'abord à étudier les conditions dans lesquelles la nicotinamide peut être utilisée.

Nous avons en premier lieu examiné l'effet d'une injection unique de nicotinamide sur le taux des nucléotides à pyridine dans le rein. La vitamine PP a été injectée aux rats à la dose de 650 mg/kg, et nous avons sacrifié les animaux à divers délais. Sur la fraction acido-soluble du tissu rénal, nous avons déterminé les nucléotides à pyridine par fluorométrie (LOWRY et COLL, 1957) et le NAD par la méthode enzymatique de CIOTTI et KAPLAN (1957). Nous avons également mesuré l'absorption dans l'UV à 260 mμ (E_{260}) dans cette préparation (KAPLAN et COLL, 1956).

La figure 1 montre l'évolution de ces trois facteurs dans les 24 heures qui suivent l'injection de la nicotinamide. La quantité totale des nucléotides à pyridine ainsi que le taux du NAD s'élèvent rapidement après l'injection et atteignent leur maximum vers la 11e heure. On observe alors des valeurs 5,5 fois plus élevées que la normale, puisque le dosage fluorométrique indique 2.000 μg/g de tissu rénal pour une valeur de départ de 350 μg, le dosage enzymatique indique 1.750 μg de NAD pour une valeur de départ de 325 μg.

FIGURE 1

SYNTHESE DU NAD APRES INJECTION DE NICOTINAMIDE



Après la 13e heure, le taux de NAD décroit rapidement; 24 heures après l'injection, la quantité de NAD est encore nettement supérieure à la normale. Il existe une nette dissociation entre la courbe du NAD et celle des coenzymes à pyridine. Dans les premières heures, la correspondance est bonne mais vers la 11e heure le taux de NAD ne représente que 88% de la valeur globale des nucléotides à pyridine formés. Cet écart reste ensuite constant dans les délais ultérieurs. Par conséquent l'élément qui est synthétisé le premier est le NAD, auquel vient ensuite s'ajouter le NADP. Ceci est en accord avec les travaux de KAPLAN et COLL (1956) et avec le fait que le NADP provient de la phosphorylation du NAD. L'injection de nicotinamide provoque donc surtout une fabrication accrue du NAD. Aucune accumumation de NMN, leprécurseur direct du NAD, n'a pû être démontrée.

Il est à noter que dans le rein de la souris la valeur maximum de NAD est atteinte également 13 heures après l'injection de la nicotinamide, alors que dans le foie le taux le plus élevé des PN s'observe à la 8e heure.

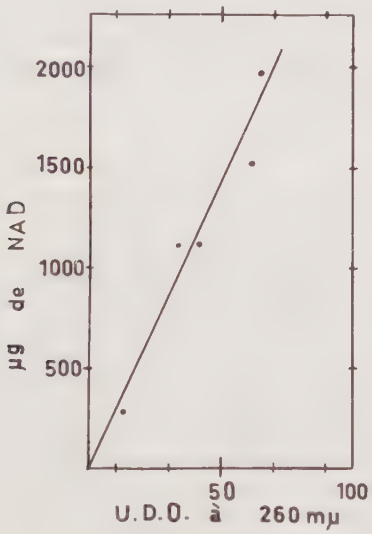
L'absorption à 260 mµ de la fraction acido-soluble du tissu rénal augmente également pendant la synthèse du NAD. La figure 1 montre qu'un maximum est atteint vers la 9e heure. Quelle est la signification des variations de E_{260} ? Selon KAPLAN et COLL (1956) elles indiquent une néosynthèse de nucléotides adényliques. En effet, si la fraction adénylique du NAD était prélevée sur le

pool des nucléotides à adénine du rein, aucune variation de E_{260} ne devrait être constatée puisque la partie pyridinique du coenzyme n'est responsable que d'une faible partie de l'absorption moléculaire du NAD. L'élévation de E_{260} indique par conséquent selon cette hypothèse un accroissement de la teneur du rein en adénine qui correspond à la synthèse du NAD.

Cette hypothèse est corroborée par le fait qu'il existe un strict parallélisme entre les variations de E_{260} et des nucléotides à pyridine. Ce parallélisme est

FIGURE 1a

CORRESPONDANCE ENTRE E_{260} ET LA SYNTHESE DU NAD



illustré dans la figure 1a qui indique l'augmentation absolue du NAD par rapport à celle de E_{260}. La courbe montre qu'à 1 unité de densité optique correspond 30 µg de NAD. Le calcul à partir du coefficient d'extinction millimolaire du NAD (KORNBERG et HORECKER, 1953) donne une valeur de 33 µg pour 1 u.d.o. L'accord entre ces deux valeurs est donc satisfaisant. Dans certains cas on pourra se contenter de la mesure de E_{260} pour apprécier la quantité de NP synthétisée. Cette courbe a été établie, en partie, dans les conditions expérimentales mentionnées avec les résultats expérimentaux présentés dans le tableau 2. En effet, poursuivant l'étude des possibilités d'utilisation de la nicotinamide nous avons modifié les conditions d'administration. Pour maintenir stimulé le taux de synthèse des PN pendant un délai supérieur à 13 heures, l'injection d'une dose unique de nicotinamide ne suffit pas. Nous avons donc procédé à deux (ou plusieurs) injections espacées de 13 heures en 13 heures. Le tableau 2 montre que dans ces conditions après 24 heures le taux de DPN reste très élevé.

TABLEAU 2

SYNTHESE DES COENZYMES A PYRIDINE SELON LES CONDITIONS D'ADMINISTRATION DE LA NICOTINAMIDE

Conditions d'injection		Nucleotides à pyridine	E_{260}
Temps	Dose par kg de rat	Par G. de rein	
13 h.	500 mg	1.400 µg	116 udo
13 h.	650 mg	1.810 µg	143 udo
24 h.	500 mg/13 h.	2.300 µg	149 udo
0	0	350 µg	85 udo

Nous avons adopté comme technique d'administration de la nicotinamide, pour les délais prolongés, l'injection biquotidienne d'une dose de 50 ou de 65mg pour 100 g de poids corporel.

B. EFFETS DE LA NICOTINAMIDE SUR LA SYNTHÈSE DE L'ARN

Nous venons de voir qu'il est possible de provoquer une synthèse importante de NAD dans le rein par l'administration de nicotinamide. Nos recherches sur une éventuelle corrélation entre le métabolisme du NAD et la croissance ont donc été entreprises par l'étude de l'action de l'amide nicotinique sur les divers éléments qui interviennent au premier chef dans la croissance cellulaire: les protéines et les acides nucléiques. Les protéines sont en effet du point de vue quantitatif le constituant le plus important du protoplasme (l'eau exceptée), et du point de vue qualitatif, parce qu'elles forment le grand groupe des enzymes, elles ont un rôle prédominant dans toutes les synthèses de la cellule. Les acides nucléiques et notamment l'ARN sont étroitement liés à la fabrication des protéines plastiques et des enzymes. Cette notion capitale pour la biologie, qui s'est imposée depuis les travaux de BRACHET (1941) et de CASPERSON (1941) n'a fait que s'affirmer durant les dernières années.

S'il est acquis que la quantité d'ARN d'un tissu indique l'intensité de ses synthèses protéiques (BRACHET, 1960), la simple détermination du taux de l'acide nucléique ne permet pas toujours de déceler des modifications métaboliques légères. L'incorporation du radiophosphate $^{32}PO_4$ dans l'ARN, au contraire, est un indice de l'activité des systèmes enzymatiques impliqués dans la biosynthèse des acides nucléiques. On peut ainsi mesurer la vitesse de renouvellement des nucléotides dans la chaîne macromoléculaire qui est fonction de l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme de l'ARN.

Pour apprécier l'effet d'une synthèse accrue de NAD sur l'ARN nous avons donc étudié le taux des acides nucléiques et des protéines dans le rein et mesuré l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans les molécules ribonucléiques.

Nous avons d'abord examiné l'action de la nicotinamide à la dose de 500 mg/kg/13 heures pendant 24 heures. Le $^{32}PO_4$, 3mc/kg, est administré dès

TABLEAU 3

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR LE METABOLISME DE L'ARN

Incorporation du $^{32}PO_4$ après un traitement de 24 h.

	Exp. N°	Témoins	+ Nicotinamide	diff. en p. cent
Protéines	1	131	131	0
1 g de rein	2	128	129	0
mg	3	154	158	+ 2
ARN	1	10,00	9,30	— 7
1 g de rein	2	10,48	9,75	— 7
µM de nucléot.	3	10,90	12,00	+ 12
Activ. spécif.*	1	28,2	19,2	— 32
Relat. ARN	2	25,6	20,0	— 22
x 100	3	32,8	24,0	— 27
E_{260} udo	1	82,5	118	+ 43
1 g de rein	2	79	106	+ 34
NAD mµM	2	580	2320	+ 300
1 g de rein	3	520	1960	+ 275
ADN 1 g rein µM de nucleot.	1	12,3	12,1	0

* L'activité spécifique du PO_4 minéral est en moyenne de 158 cpm/µAt P pour les témoins et de 167 pour les animaux traités.

le début de l'expérience. On constate, tableau 3, l'absence de modification de la teneur du tissu rénal en protéines, en ARN et en ADN. Cependant l'activité spécifique de l'ARN, rapportée chez les divers animaux à l'activité spécifique, des ions PO_4 minéraux, montre que la nicotinamide provoque une baisse importante de l'incorporation du radiophosphore dans les ribonucléotides. Cet effet traduit une inhibition de - 26% en moyenne du renouvellement de l'ARN. Nous avons vérifié que l'injection de nicotinamide a bien provoqué dans ces expériences la synthèse de coenzyme attendue. L'augmentation de l'absorption dans l'ultra-violet (260 mµ) (E_{260}) de la fraction acido-soluble du tissu indique aussi l'intensité de la synthèse de NAD (voir paragraphe précédent). Phénomène intéressant sur lequel nous aurons à revenir, il y a une correspondance entre la stimulation de la production de NAD et l'inhibition du renouvellement de l'ARN. Plus la synthèse du premier est grande et plus l'inhibition du second est grande.

Un jour après le début du traitement, il se manifeste donc un trouble du métabolisme de l'ARN, sans aucune modification de la quantité absolue présente dans le tissu rénal. En prolongeant le traitement par la niacinamide, peut-on accentuer les effets constatés? Dans une seconde série expérimentale, nous avons administré la nicotinamide (500 mg/kg/13 heures) pendant plusieurs jours. Aucune variation du poids des rats n'a été enregistrée. Le tableau 4 indique que dans aucune des quatre expériences réalisées on ne peut déceler de modification significative des constuants protéiques et nucléiques. Pourtant, à ces délais,

TABLEAU 4

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR LE METABOLISME DE L'ARN

Evolution de l'ARN et des protéines pendant un traitement prolongé de 5 jours.

	Exp. N°	Témoins	+ Nicotinamide	diff. en p. cent
Poids 1 rein mg	5	776	765	— 1
	6	790	787	0
	7	931	758	— 18
	8	900	801	— 10
Protéines 1 g de rein mg	5	175	173	— 1
	6	122	130	+ 6
	7	150	166	+ 10
	8	124	126	+ 1
ARN 1 g de rein µM de nucléot.	5	10,70	10,20	— 5
	6	7,55	8,05	+ 7
	7	9,78	10,42	+ 7
	8	7,75	8,10	+ 5
E_{260} 1 g de rein udo	5	80	95	+ 20
	6	79	146	+ 83
	7	80	120	+ 60
	8	74	100	+ 35
ARN (µM) Protéines (mg)	5, 6, 7, 8	0,0625 ± 0,001	0,0615 ± 0,002	

l'augmentation de E_{260} est très forte. Il semble donc impossible de provoquer par l'injection de nicotinamide une baisse du taux d'ARN rénal qui serait une conséquence directe de l'inhibition du métabolisme constatée après les premières 24 heures. Tout se passe comme si la cellule rénale arrivait à compenser les altérations de la synthèse de l'ARN, c'est-à-dire à s'adapter à une augmentation de la synthèse de NAD. Cette adaptation est-elle encore possible dans un tissu qui doit fabriquer de grandes quantités d'ARN ? Pour examiner ce point important, nous avons étudié l'effet de la nicotinamide sur l'hypertrophie rénale compensatrice.

C *EFFETS DE LA NICOTINAMIDE SUR LA SYNTHÈSE D'ARN AU COURS DE L'HYPERTROPHIE RENALE COMPENSATRICE*

Après la nephrectomie unilatérale, le rein restant en place subit une croissance qui lui permet d'accomplir à lui seul le travail des deux néphrons. Ce phénomène qui a été décrit sous le nom d'hypertrophie compensatrice (HRC), a fait l'objet de nombreuses études dans le laboratoire où nous avons travaillé. L. MANDEL (1955) a montré que la manifestation majeure de l'HRC résidait

dans une néosynthèse d'ARN et de protéines. Cette synthèse apparaît très rapidement après la nephrectomie puisque dès les premiers jours la teneur de l'ARN s'élève de 20%. Cet accroissement précoce est la conséquence de la stimulation du métabolisme ribonucléique qui se traduit après les premières 24 heures par une incorporation augmentée de $^{32}PO_4$ dans l'ARN. C'est donc bien l'ARN qui joue le rôle prépondérant dans ce phénomène d'hypertrophie. Toutes nos connaissances sur la fonction des AN dans la synthèse protéique confirment cette façon de voir. Après deux semaines, la hausse des taux d'ARN et de protéines atteint les 2/3 de sa valeur finale à deux mois. Au contraire, la quantité d'ADN ne commence à s'élever qu'un mois après l'opération.

Nous avons déjà rappelé que la quantité de protéines et d'ARN est un bon critère de la masse de la cellule, alors que la charge en ADN indique le nombre des cellules présentes dans le tissu. On peut donc distinguer dans l'HRC deux phases, l'une d'hypertrophie, c'est-à-dire d'élargissement du volume protoplasmique, et l'autre d'hyperplasie, c'est-à-dire de multiplication cellulaire. Ces deux phases sont très étroitement liées et aboutissent à une reprise de la croissance de l'organe. Le développement d'un tissu se divise en effet en une phase intermitotique et en une phase de mitose. Pendant la première, il y a synthèse d'ARN qui provoque la fabrication des enzymes et des protéines plastiques pendant la seconde, les chaînes d'ADN se repliquent et la division cellulaire se produit. Les facteurs capables de contrôler la croissance peuvent agir sur l'une ou l'autre de ces étapes et leur mode reste pour cette raison difficile à découvrir. La séparation temporelle des phases d'hypertrophie et d'hyperplasie est une caractéristique de l'HRC.

L'hypertrophie rénale compensatrice possède donc deux avantages sur la croissance embryonnaire ou sur la régénération hépatique; d'abord, comme nous venons de le voir, il est possible d'étudier une hypertrophie cellulaire à l'état pur, ensuite la confrontation entre le tissu normal et le tissu en croissance peut se faire très exactement par la comparaison du rein enlevé pendant la néphrectomie avec le rein resté in situ et qui s'hypertrophie. C'est la raison essentielle du choix que nous avons fait du rein comme matériel d'étude.

Nous avons opéré là aussi deux séries d'expériences: l'une pour étudier l'effet de la nicotinamide sur l'élévation précoce du métabolisme ribonucléique, l'autre pour apprécier les effets de la vitamine sur les néosynthèses d'ARN et de protéine.

1. HYPERTROPHIE RENALE BREVE

Dans la première série expérimentale, 3 lots de 6 animaux ont été étudiés. Dans chaque lot, 2 rats ont servi de témoins, 2 autres ont été nephrectomisés, et les 2 derniers, ayant également subi une nephrectomie, ont reçu la nicotinamide (500 mg/kg/13 heures). Tous les animaux ont reçu 3 mc de $^{32}PO_4$/kg, dès le début de l'expérience et ont été sacrifiés 24 heures après.

Les résultats expérimentaux sont rapportés dans le tableau 5. A ce bref délai de 24 heures, seule l'activité spécifique de l'ARN présente des variations significatives. Dans l'hypertrophie elle s'élève de 20% en moyenne au dessus de la normale, ce qui correspond à la stimulation de la biosynthèse d'ARN qui marque le début de l'HRC. Chez l'animal traité par la nicotinamide aucune stimulation n'est observée et la valeur de l'AS de l'ARN reste légèrement inférieure

TABLEAU 5

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR L'HYPERTROPHIE RENALE COMPENSATRICE

Incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN. Durée de l'hypertrophie et du traitement à la nicotinamide : 24 heures.

	Exp. N°	Témoins	Hypertrophie		Hypertrophie + Nicotinamide	
				diff. en p. cent		diff. en p. cent
Poids 1 rein mg	1	970	970	0	1010	+ 4
	2	970	1010	+ 4	894	— 8
	4	933	973	+ 4	923	— 2
Protéines 1 g de rein mg	1	128	128	0	126	— 2
	2	128	126	— 2	131	+ 2
	4	130	125	— 4	118	— 9
ARN 1 g de rein µM de nucleot.	1	10,05	10,45	+ 4	9,55	— 5
	2	10,45	10,50	0	9,95	— 5
	4	7,88	7,48	— 5	6,70	— 15
Activ. spécif. Relat. ARN x 100	1	28,2	33,2	+ 19	24,2	— 13
	2	25,6	30,4	+ 21	23,4	— 7
	4	22,0	25,5	+ 16	20,9	— 5
E_{260} udo 1 g de rein	1	82	101	+ 22	155	+ 88
	2	79	92	+ 16	110	+ 40

TABLEAU 6

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR L'HYPERTROPHIE RENALE COMPENSATRICE

Comparaison du phénomène d'hypertrophie chez les animaux normaux et chez les animaux traités par la nicotinamide*.

	Exp. N°	Animaux normaux			Animaux traités à la nicotinamide		
		Rein témoin	Rein hypert.	diff. en p. cent	Rein témoin	Rein hypert.	diff. en p. cent
ARN 1 g de rein µM de nucleot.	1	10,05	10,45	+ 4	9,30	9,55	+ 2
	2	10,45	10,50	0	9,75	9,95	+ 2
Activ. spécif. Relat. ARN x 100	1	28,2	33,2	+ 19	19,2	24,2	+ 26
	2	25,6	30,4	+ 21	20,0	23,4	+ 18

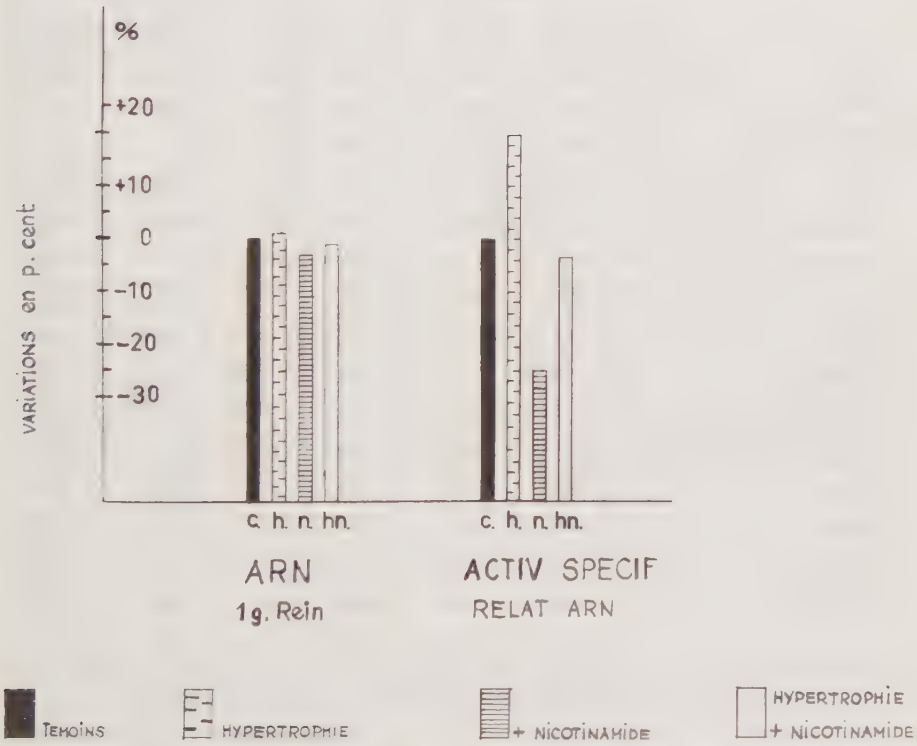
* Les valeurs présentées sont tirées des tableaux 3 et 5.

à la normale. L'hypertrophie ne peut donc pas se traduire quand la synthèse du NAD est augmentée comme l'atteste l'augmentation de E_{260}.

Néanmoins, pour pouvoir apprécier l'effet isolé du stimulus hypertrophiant, il faut comparer les animaux néphrectomisés et traités à la niacinamide avec des animaux qui ont, eux aussi, reçu la même dose de vitamine. Cette comparaison est faite dans le tableau 6 : l'activité spécifique de l'ARN est stimulée par la néphrectomie controlatérale avec la même intensité que chez les témoins. La figure 2 permet de se rendre mieux compte des modifications du métabolisme de

FIGURE 2

ACTION DE LA NICOTINAMIDE SUR LE RENOUVELLEMENT DE L'ARN



l'ARN : le rein en hypertrophie des animaux traités présente une AS ARN qui est la résultante de l'action stimulante de l'hypertrophie et de l'action inhibitrice de la nicotinamide. Ceci indique une certaine forme d'équilibre entre la synthèse d'ARN et l'effet produit par la synthèse de NAD.

2. HYPERTROPHIE RENALE DE LONGUE DUREE

Dans le paragraphe précédent nous avions noté l'adaptation possible du tissu à l'action prolongée de la nicotinamide; nous avons donc étudié des hypertrophies de plus longue durée. Vingt rats répartis en 5 lots homogènes ont été néphrectomisés. Dans chaque lot la moitié des animaux est traité par la nicotinamide (500 ou 650 mg/kg/13 heures). Le sacrifice a eu lieu 4 ou 5 jours après l'opération. Les tableaux 7 et 8 indiquent les diverses conditions expérimentales pour

TABLEAU 7

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR L'HYPERTROPHIE RENALE COMPENSATRICE

Hypertrophie et traitement à la nicotinamide (500 mg/kg)
de longue durée : 4 et 5 jours*.

	Exp. N°	Animaux normaux			Animaux traités à la nicotinamide		
		Rein témoin	Rein hypert.	diff. en p. cent	Rein témoin	Rein hypert.	diff. en p. cent
Poids 1 rein mg	9	813	971	+ 20	935	1010	+ 17
	10	749	986	+ 30	790	785	0
	11	786	1015	+ 29	873	996	+ 14
Protéines 1 rein mg	9	127	158	+ 24,5	156	174	+ 11,5
	10	99	128	+ 29	96	102	+ 6,5
	11	100	163	+ 63	95	131	+ 38
ARN 1 rein µM de nucleot.	9	7,48	9,35	+ 25	8,78	9,50	+ 8
	10	6,28	9,18	+ 46	5,85	8,70	+ 20
	11	6,72	10,95	+ 63	6,40	7,05	+ 36
NAD 1 rein muM	9	542	645	+ 18	433	3150	+ 627
	10	493	635	+ 28	433	2060	+ 375
	11	360	420	+ 17	418	960	+ 119
E_{260} udo 1 rein	9	74	91	+ 23	74	138	+ 87
	10	65	90	+ 38	62	104	+ 68
	11	72	85	+ 18	72	106	+ 47

* Conditions expérimentales : 9 hypertrophie et trait. nicotin. : 4 j. Age des rats : 6 M.
10 » » » : 5 j. » » : 6 M.
11 » » » : 5 j. » » : 4 M.

chacune des cinq expériences: âge des rats, durée de l'hypertrophie et dose de nicotinamide. Les résultats enregistrés varient suivant ces facteurs.

L'injection de nicotinamide provoque (tableaux 7 et 8) une inhibition de l'HRC, tant du point de vue de la synthèse de protéines que celle de l'ARN. Chez l'animal normal, le poids du rein, la teneur en protéines et en ARN aug-

TABLEAU 8

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR L'HYPERTROPHIE RENALE COMPENSATRICE

Hypertrophie et traitement à la nicotinamide (650 mg/kg/13 h.) de longue durée : 5 jours*.

	Exp. N°	Animaux normaux			Animaux traités à la nicotinamide		
		Rein témoin	Rein hypert.	diff. en p. cent	Rein témoin	Rein hypert.	diff. en p. cent
Poids 1 rein	12	933	1148	+ 23	900	955	+ 6
mg	13	1058	1296	+ 23	1014	1069	+ 5,5
Protéines	12	113	166	+ 46	113	121	+ 7,5
1 rein mg	13	134	190	+ 42	131	138	+ 5
ARN 1 rein	12	7,30	11,20	+ 53	6,90	7,45	+ 8
µM de nucleot.	13	7,85	11,50	+ 46	8,00	8,43	+ 5
NAD 1 rein	12	410	512	+ 25	425	3240	+ 661
mµM	13	432	520	+ 20	435	3140	+ 620
E_{260} udo	12	67	86,5	+ 29	67	130	+ 94
1 rein	13	77	98,5	+ 39	71	146	+ 90

* Conditions expérimentales : $\left.\begin{matrix}12\\13\end{matrix}\right\}$ hypertrophie et traitem. nicot. : 5 j. Age des rats : 6 M.

mentent très nettement durant l'hypertrophie. Cette augmentation est d'autant plus grande que l'expérience est prolongée et que l'animal est jeune. La niacinamide empêche le rein de grandir et ceci d'autant plus que l'animal est âgé et que la dose de vitamines est forte. Ainsi, dans l'expérience 11, l'hypertrophie aboutit chez le témoin à un accroissement de l'ARN rénal de 63% et chez l'animal traité de 36%. Au contraire, dans l'expérience 12, où plus de nicotinamide est administrée et où les rats sont plus vieux, l'augmentation de l'ARN est de 53% chez les témoins et de 5% seulement chez les animaux traités. Ces expériences sont éclairées par celles réalisées 24 heures après les néphrectomies. C'est le métabolisme de l'ARN qui représente le facteur princeps de l'hypertrophie; c'est à ce niveau qu'agit l'administration de nicotinamide. Dans un premier temps, le renouvellement de l'ARN ne peut s'élever au dessus de la valeur normale, comme il le fait dans le rein en hypertrophie du témoin, et la néosynthèse d'ARN est donc très ralentie, ce qui limite également les synthèses protéiques.

Il s'agit donc d'un phénomène extrêmement spectaculaire puisque dans certains cas l'HCR est complètement stoppée par l'administration de la nicotinamide. L'effet de cette drogue peut être suivi par le dosage du NAD et par la détermination de E_{260}. L'augmentation du NAD enregistrée pendant l'hypertrophie en l'absence de traitement par la vitamine est parallèle à l'accroissement de la masse cytoplasmique et si on rapporte le taux de NAD au poids frais de l'organe, aucune variation significative n'est à enregistrer. L'augmentation de E_{260} est un phénomène assez net durant l'hypertrophie. La figure 3 rapporte l'élévation de E_{260} exprimée en p. cent, en fonction de la hausse relative de l'ARN. La courbe passe par un maximum (+ 40%) qui correspond environ à une accumulation d'ARN de 47%. Si l'hypertrophie continue au-delà de cette valeur, E_{260} decroit rapide-

FIGURE 3

E_{260} AU COURS DE L'HYPERTROPHIE RENALE

(valeurs pour 1 rein)

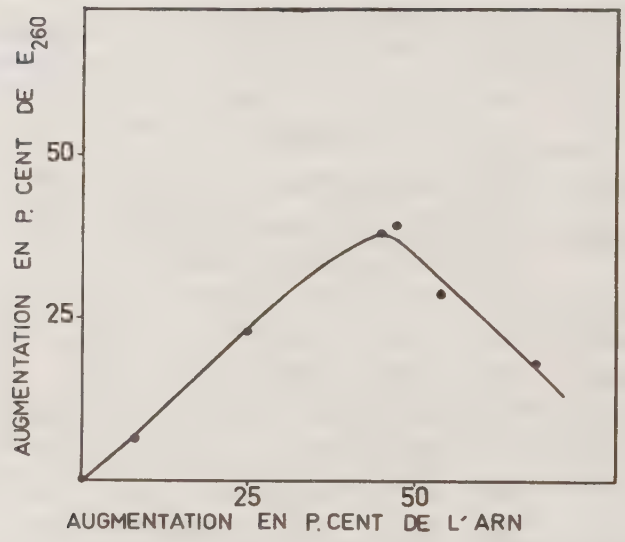
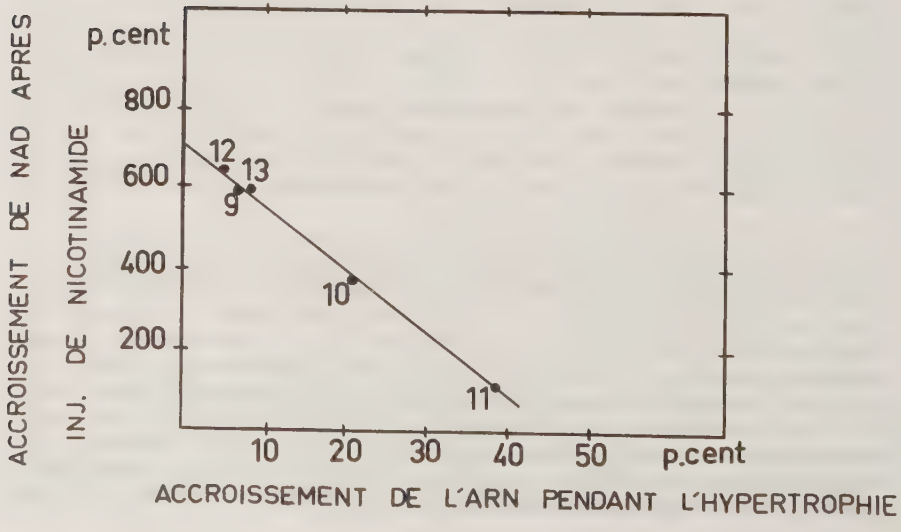


FIGURE 4

EQUILIBRE ARN - NAD

Ce graphique résume les résultats des tableaux 7 et 8



ment. L'absorption dans l'UV de la fraction acido-soluble est un indice de la concentration des nucléotides libres dont la majorité forme le pool des précurseurs de l'ARN. Il est donc normal que durant l'hypertrophie, quand la synthèse d'ARN est intense, la concentration des nucléotides libres augmente. L'accumulation de l'ARN dans le rein durant l'HRC n'est pas illimitée; la valeur maxima atteinte est de 53% supérieure à la normale (L. MANDEL, 1955). Il existe donc certainement un système régulateur qui arrête la croissance quand un certain degré est atteint, correspondant sans doute à la compensation fonctionnelle du rein manquant. La forme de la courbe de l'évolution de E_{260} est sans doute un reflet direct de ce mécanisme régulateur. La croissance s'arrête quand le taux des précurseurs est redevenu normal et n'entraîne plus de néosynthèse d'ARN. Ce phénomène fait une distinction capitale entre les croissances normales et pathologiques.

Lorsqu'on administre la nicotinamide, la synthèse du NAD est très stimulée. Pourtant il faut remarquer un fait capital: il existe un équilibre entre l'augmentation du NAD et la synthèse d'ARN. La figure 4 représente les accroissements relatifs du taux d'ARN et de NAD dans le rein en hypertrophie chez un animal traité par la nicotinamide. Il existe une relation linéaire entre ces deux phénomènes. Plus la synthèse d'ARN est importante, et moins la synthèse du NAD sera forte; plus la formation du coenzyme est intense, et plus grande sera l'inhibition de l'HRC. En faisant varier les conditions expérimentales, comme il est indiqué dans les tableaux 7 et 8, il est possible de déplacer l'équilibre vers l'un ou l'autre de ces métabolismes.

Ainsi la stimulation de la synthèse des coenzymes à pyridine, si elle ne provoque dans le tissu normal qu'une inhibition passagère du métabolisme de l'ARN, rend le rein incapable de s'hypertrophier. Le tissu rénal ne peut s'adapter à l'augmentation de la formation du NAD que si la formation d'ARN ne doit pas dépasser un certain seuil. Au-dessus de ce seuil, un équilibre s'installe entre les deux anabolismes.

La synthèse de NAD après injection de niacinamide doit donc être différente dans un tissu normal et un tissu en croissance. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons examiné l'effet de l'hypertrophie rénale compensatrice sur la formation du NAD.

D. EFFET DE L'HYPERTROPHIE RENALE COMPENSATRICE SUR LA SYNTHÈSE DU NAD

Le taux de NAD est plus faible dans les tissus en croissance, que la croissance soit normale ou pathologique (MORTON, 1958). La synthèse des nucléotides à pyridine après administration de nicotinamide est elle aussi réduite dans ces tissus (DE BURGH, 1957; MANDEL et COLL, 1961). L'influence de l'hypertrophie rénale sur les nucléotides à pyridine est donc un point important à préciser dans l'analyse des corrélations ARN-NAD.

Nous avons donc comparé la formation des coenzymes à pyridine dans le rein normal et le rein en hypertrophie après 48 heures. C'est à ce délai que l'augmentation de l'ARN, qui précède l'hypertrophie proprement dite, est la plus rapide.

Un total de 80 rats ont été groupés en lots de 6 animaux dont 3 ont été néphrectomisés et 3 ont servi de témoins. Chaque rat a permi l'étude du taux de NAD à des délais variables suivant injection unique de nicotinamide (650 mg/kg). Le dosage fluorométrique et le dosage enzymatique ont été effectués sur la fraction acido-soluble du rein. Le poids frais du rein hypertrophié est de 15 à 40% supérieur au poids du rein prélevé au cours de la néphrectomie.

TABLEAU 9

EFFET DE L'HYPERTROPHIE RENALE SUR LA SYNTHESE DU NAD APRES INJECTION DE NICOTINAMIDE*

Pour 1 g de rein	Témoins	Hypertrophie de 2 jours	Différence des moyen. p. cent
Nucleotides à pyridine mμM	2920 ± 120	1760 ± 430	— 40
NAD mμM	2620 ± 89	1580 ± 400	— 36

* Ces valeurs sont la moyenne de 6 déterminations faites entre 10 h. 30 et 13 h. après l'injection de 650 mg/kg de nicotinamide.

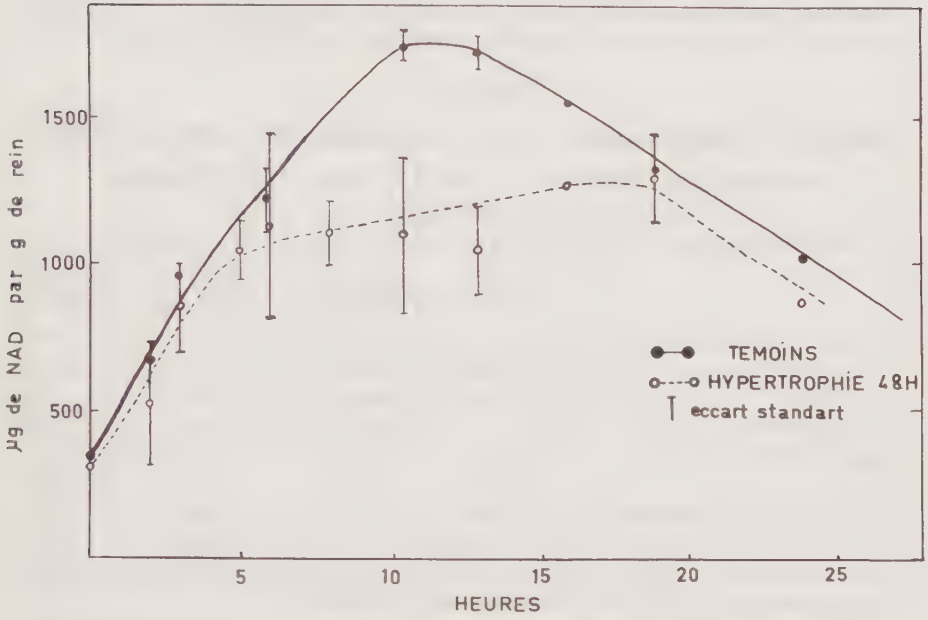
Le tableau 9 indique que le taux maximum de NAD atteint dans le rein en hypertrophie est de 40% plus faible que dans le rein au repos. Ces valeurs sont les résultats de six déterminations faites avec des lots différents d'animaux. La dispersion des résultats analysés statistiquement montre une bonne constance de la valeur des témoins et une grande variabilité des valeurs obtenues au cours de l'hypertrophie. La différence reste pourtant significative dans tous les cas. La dispersion des résultats est certainement dûe à des différences dans la réponse du rein au stimulus hypertrophique. Il n'a cependant pas été possible d'établir un rapport strict entre l'augmentation pondérale du rein et le taux de la synthèse du NAD. Toutefois, une série d'expériences réalisées 24 heures après la nephrectomie indique des inhibitions nettement plus faibles (-20%) correspondant à un stade où la formation d'ARN n'est pas encore fortement stimulée.

L'étude cinétique de la production du coenzyme dans le rein en hypertrophie après une injection de nicotinamide (650 mg/kg) est présentée dans la figure 5. Le taux de synthèse initial est voisin de celui des témoins mais un plateau est atteint rapidement. Dès la 5e heure, à la 15e heure, la valeur de NAD ne s'élève plus. Entre 15 et 20 heures, une légère synthèse réapparaît puis la décroissance se fait parallèlement à celle des témoins. Là encore, il existe une une grande variabilité des résultats comme le montrent les déviations standards représentées sur ce graphique.

L'étude cinétique de la synthèse de NAD dans le rein en hypertrophie donne par comparaison avec la courbe obtenue dans un tissu normal des indications précieuses quant au mécanisme de l'inhibition observée. Il faut constater, en effet, que dans l'hypertrophie la vitesse initiale du processus enzymatique n'est pas modifiée mais la production de NAD s'arrête plus tôt que chez les témoins.

FIGURE 5

EFFET DE L'HYPERTROPHIE SUR LA SYNTHESE DU NAD



Ceci est en faveur d'une carence en l'un des précurseurs du NAD. Selon l'hypothèse que nous avons indiquée dans l'introduction de cette thèse, l'ATP pourrait bien être responsable de ces phénomènes.

Quoiqu'il en soit, l'existence d'un équilibre entre la synthèse de l'ARN et celle du NAD est confirmée par ces expériences. Pour que la réalité d'un tel équilibre soit assise, il faut qu'il existe dans la cellule un site où les deux métabolismes évoqués puissent s'opposer.

E. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE L'EFFET DE LA NICOTINAMIDE

Nous avons donc recherché à localiser dans la cellule le point où l'effet de la nicotinamide sur le métabolisme de l'ARN se produisait le plus précocement. De toutes les parties de la cellule, le noyau semble être l'organite de choix pour le siège de cette corrélation: c'est dans le noyau en effet que se trouve le système enzymatique qui synthétise le NAD (HOGEBOOM et SCHNEIDER, 1952) et celui qui est impliqué dans la complexe biosynthèse de l'ARN.

Après un traitement de 24 heures par l'amide nicotinique, dans les conditions décrites plus haut, l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN est réduite de 26% environ. Le traitement correspond à deux injections de la vitamine; nous avons donc examiné l'effet d'une injection unique.

Nous avons utilisé 3 lots de 10 rats dont 5 servaient de témoins et 5 recevaient 500 mg/kg de nicotinamide. Tous les animaux recevaient dès le début de l'expérience 3 mc/kg de $^{32}PO_4$. Les rats sont sacrifiés 13 heures après ces injections;

le tissu rénal homogénéisé dans une solution de saccharose est divisé en deux fractions. L'une sert à la détermination de l'activité spécifique de l'ARN total de l'homogénat et du PO_4 minéral, l'autre est traité en vue de l'isolement des noyaux par centrifugation en solution saccharosée hypertonique (p. 11). Sur les noyaux isolés, on détermine l'activité spécifique de l'ARN nucléaire.

TABLEAU 10

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR LE METABOLISME DE L'ARN NUCLEAIRE

Incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN, 13 heures après l'injection de nicotinamide (500 mg/kg) et de $^{32}PO_4$

		Exp. N°	Animaux normaux	Animaux traités à la nicotinamide	diff. en p. cent
Activ. spécif. Relat. ARN* x 100	Tissu entier	14	20,0	19,4	— 3
		15	20,2	19,9	— 1
		16	18,6	18,2	— 2
	Noyaux	14	12,5	10,4	— 17
		15	15,1	10,3	— 32
		16	10,4	8,0	— 23

* L'activité spécifique du PO_4 minéral est en moyenne de 250 cpm/uAt P.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau 10. On constate que 13 heures après l'injection de $^{32}PO_4$, l'activité spécifique de l'ARN nucléaire est inférieure à celle de l'ARN cellulaire total. L'administration de nicotinamide limitée au délai de 13 heures ne provoque pas de modification de l'activité spécifique de l'ARN total de la cellule. Dans le noyau au contraire, l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN est fortement inhibée. Ainsi, il est possible de déceler dans le noyau cellulaire une altération du métabolisme de l'ARN, dûe à la stimulation de la synthèse des coenzymes à pyridine, avant que l'ARN cytoplasmique ne soit lui-même atteint par ce phénomène.

Ces observations confirment d'abord l'existence de l'équilibre ARN-NAD que nous avons constaté dans la cellule rénale. Il existe bien un site défini où se produit une interaction entre les deux métabolismes.

C'est dans le noyau cellulaire que les synthèses de NAD et d'ARN rentrent en compétition. Cette localisation nucléaire aura des perspectives intéressantes: dans le noyau se fait l'assemblage du NMN et de l'ATP pour former le NAD; dans le noyau également les systèmes enzymatiques responsables de la synthèse des ARN utilisent les nucléosides triphosphates. Le point d'interaction entre les métabolismes des coenzymes à pyridine et les acides nucléiques serait peut-être la compétition entre deux enzymes nucléaires pour l'utilisation de l'ATP. Considérant cette hypothèse de travail, nous avons orienté notre travail dans une double voie : d'une part la recherche du type d'ARN qui participe à cette compétition, d'autre part, l'élucidation du mécanisme en cause.

Ces recherches qui ont nécessité évidemment une étude préalable du noyau cellulaire font l'objet de la deuxième partie de notre thèse.

CHAPITRE II

ÉTUDES DE LA CORRÉLATION ARN-NAD DANS LE NOYAU

Nous avons divisé cette étude en deux parties suivant la méthode et le but des expériences. D'abord in vivo nous avons recherché à déterminer à l'intérieur du noyau les perturbations qu'entraîne la nicotinamide. En effet, le noyau a une structure et une biochimie complexe à l'image de celle de la cellule toute entière; il fallait donc d'abord entreprendre une étude du métabolisme nucléique nucléaire.

D'autre part in vitro, nous avons tenté, sur des noyaux isolés, de reproduire l'effet ARN-NAD avec leNMN qui est utilisé par un enzyme nucléaire pour former du NAD. Cette étude tendait principalement à éclaircir le mécanisme de la corrélation démontrée dans le chapitre précédent.

I. IN VIVO

A. LE MÉTABOLIME DES ARN DU NOYAU

1. ETUDE GLOBALE DE L'ARN NUCLEAIRE RENAL

Sur les noyaux isolés selon la méthode décrite, par centrifugation du tissu homogénéisé dans une solution de saccharose 2,2 M à 54.000 g pendant 60 min.; nous avons d'abord étudié les quantités d'AN et de protéines. Il est capital de trouver une valeur de référence pour exprimer rationnellement le taux des divers composés du noyau. Le rendement en noyau est variable et n'est que de 60 à 65% si on calcule le pourcentage de l'ADN retrouvé dans les noyaux isolés par rapport à la quantité existant dans le tissu qui a servi à la préparation (Tabl. 11). Dans ces conditions, il n'est pas possible de rapporter le taux des constituants chimiques des noyaux à une unité de poids d'organe. Seule est satisfaisante l'expression des résultats par rapport à l'ADN qui est totalement intranucléaire.

Le tableau 11 compare la teneur en ARN et en protéines de l'homogénat total et des noyaux. Nous n'avons pas étudié la fraction surnageant après centrifugation dans le saccharose hypertonique car sa récupération est difficile et incertaine. Les noyaux contiennent environ 8% de l'ARN total de la cellule et 6% des protéines. D'autre part, l'ARN ne représente pas plus de 8% des acides nucléiques du noyau, proportion bien plus faible que dans la cellule hépatique (20%) (DAVIDSON, 1960).

Comme nos recherches concernent avant tout le métabolisme de l'ARN, nous avons mesuré l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans les ARN du rein en fonction du temps.

TABLEAU 11

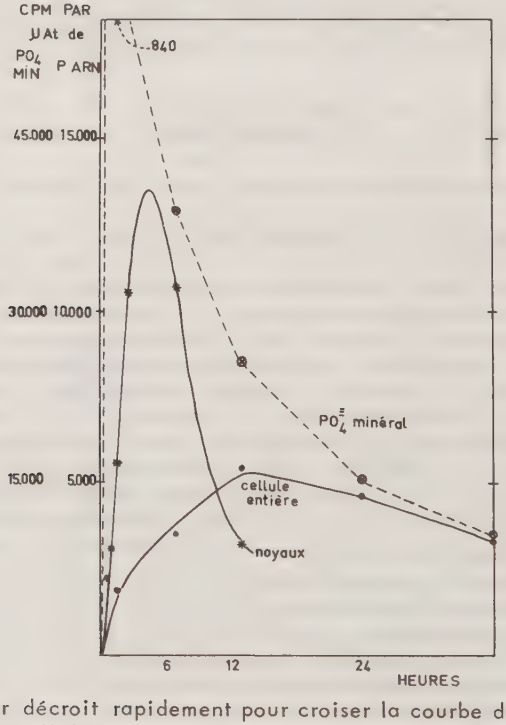
COMPOSITION CHIMIQUE DES NOYAUX CELLULAIRES DU REIN DE RAT

	Tissu entier	Noyaux celullaires	Rendement
ADN pour 1 g de rein μM de nucleot.	$8,83 \pm 2,5$	4,85 — 5,2	60 p. cent
ARN / ADN $\mu M / \mu M$	$1,3 \pm 0,3$	0,07 — 0,08	
Protéines / ADN mg / μM	$17,5 \pm 2,5$	1,0 — 1,1	

La figure 6 indique que l'activité spécifique de l'ARN nucléaire s'élève rapidement après injection du radiophosphore pour atteindre un maximum vers la 5e heure.

FIGURE 6

INCORPORATION DU $^{32}PO_4$ DANS L'ARN DU REIN CHEZ LE RAT



Puis cette valeur décroit rapidement pour croiser la courbe de l'activité spécifigure de l'ARN cellulaire vers la 11e heure. En effet, l'entrée de l'isotope dans l'ARN du tissu considéré dans son ensemble est plus lente que dans l'ARN

nucléaire et un maximum n'est atteint que vers la 13e heure. La décroissance s'amorce alors et se prolonge pendant plusieurs jours (PEREY et COLL, 1953). On peut suivre également la pénétration du ^{32}P dans le pool des ions PO_4 minéraux de la cellule qui après une ascension rapide et un maximum dans la première heure, présente une décroissance exponentielle.

L'incorporation du phosphore radioactif est donc plus précoce dans l'ARN nucléaire que dans l'ARN cytoplasmique. De nombreux biochimistes se sont basés sur ce fait pour affirmer l'origine nucléaire des ARN de la cellule. Tous les ARN seraient synthétisés dans le noyau et migreraient ensuite vers le cytoplasme. Le fait principal qui s'oppose à cette conception est la discordance entre la constitution des ARN de ces deux compartiments cellulaires. Nous reviendrons dans la discussion sur ce problème important. Néanmoins, il n'est pas possible de considérer l'ARN nucléaire comme homogène; tous les travaux récents montrent qu'on retrouve dans le noyau plusieurs types d'ARN qui correspondent aux divers ARN connus dans la cellule (VINCENT, 1957; LOGAN et DAVIDSON, 1957; OSAWA et COLL, 1957).

La classification des ARN peut se faire de deux manières. Soit selon leur localisation dans les fractions subcellulaires: mitochondries, micromoses, surnageant ou liquide cellulaire; soit selon leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. La compréhension du fonctionnement de la cellule et spécialement du rôle du noyau, dans la régulation de la synthèse protéique et de la croissance, nécessite une connaissance approfondie de ces deux domaines. La mise au point de techniques de fractionnement des ARN nucléaires devait donc précéder toute étude d'une éventuelle régulation nucléo-cytoplasmique.

2. RECHERCHE D'UN FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE

Le schéma général du fractionnement est essentiellement différent selon le type de classification choisi. Dans le premier cas il s'agit d'isoler les divers compartiments nucléaires puis de doser les ARN qui s'y trouvent. Dans le second il faut d'abord extraire les ARN du noyau en leur totalité puis ensuite les fractionner par diverses méthodes physico-chimiques. C'est par la synthèse des données acquises par ces deux voies divergentes que des conclusions fructueuses peuvent être dégagées.

a) FRACTIONNEMENT DU NOYAU CELLULAIRE

L'étude des fractions subnucléaires a été entreprise depuis près de 8 ans par ALLFREY, MIRSKY et OSAWA (1955). Etudiant l'incorporation des acides aminés radioactifs dans les noyaux isolés de thymus, ils ont mis au point une technique permettant de séparer 3 fractions nucléaires. Cette méthode a servi à cette même équipe pour l'étude de l'ARN nucléaire (ALLFREY et MIRSKY, 1957) et a été reprise dans d'autres laboratoires (LOGAN et DAVIDSON, 1957; OSAWA et COLL, 1957).

Le fractionnement se fait en deux étapes. On procède d'abord à l'extraction par un tampon neutre des éléments nucléaires extra-chromosomiques (suc nucléaire). Dans un deuxième temps on extrait par le NaCl M les acides nucléiques chromosomiques: principalement de l'ADN et une faible portion d'ARN. Le résidu de ce traitement salin est formé par les nucléoles, riches en ARN (ALLFREY et MIRSKY, 1957; ZBARSKY et GEORGIEV, 1959).

Parallèlement à cette méthode une autre technique a été développée, basée sur un traitement de l'homogénat de noyaux par le phénol. En effet, les divers complexes nucléoprotéiques ne sont pas scindés d'une manière égale par le phénol utilisé selon le procédé original de KIRBY (1956). En faisant varier la nature de la phase aqueuse et de la phase phénolique, on peut séparer divers types d'ARN nucléaires. Ce sont les chercheurs russes groupés autour de GEORGIEV et COLL (1961) qui ont défini les conditions de ce fractionnement. Bien qu'il s'agisse là d'une méthode qui fournit directement de l'ARN purifié, nous la plaçons dans le cadre des techniques de fractionnement des structures nucléaires car l'extractibilité des divers ARN est fonction de la force de leur liaison avec les protéines et dépend donc autant du constituant protéique que de la nature moléculaire de l'acide nucléique. De plus, comme la méthode d'ALLFREY et MIRSKY (1957), le fractionnement phénolique permet également de séparer les éléments extra-chromosomiques et l'appareil nucléolochromosonique lui-même .

Dans une première étape on peut extraire les ARN du suc nucléaire dans leur majoriré avec le système: phénol pH 6,0-NaCl 0,14 M (NS-RNA). L'appareil nucléolochromosomal restant, traité par le système phénol pH 8,3-NaCl 0,14 M fournit deux types d'ARN. Dans la phase aqueuse on trouve un ARN de haut poids moléculaire (N-RNA-E) ainsi que de l'ADN provenant des chromosomes. Dans la phase phénolique il reste un autre ARN de haut poids moléculaire dont la provenance est également chromosomique et nucléolaire(N-RNA NE). GEORGIEV et COLL (1951) ont étudié le métabolisme de ces différentes fractions d'ARN dans le noyau des cellules de l'ascite d'Ehrlich. Les cellules sont incubées in vitro dans un milieu contenant du $^{32}PO_4$ puis réinjectées à un animal sain. Après un délai plus ou moins prolongé, les cellules sont récoltées, les noyaux isolés et le fractionnement phénolique effectué. L'ARN N-RNA NE, qui reste dans le résidu après les deux traitements par le phénol, possède le renouvellement le plus intense.

Nous avons tenté de reproduire ce type de fractionnement dans le noyau des cellules rénales. Le tableau 12 montre le résultat des expériences que nous avons

TABLEAU 12

FRACTIONNEMENT PHENOLIQUE DES ARN DU NOYAU CELLULAIRE

Fraction	Pourcentage de l'ARN nucléaire	Pourcentage de l'ADN	Activ. spécif. cpm / uM nucleot. 30 min.*	60 min.*
NS-RNA	37 p. cent	< 1	17.820	20.305
N-RNA-E	51 p. cent	93	6.950	14.810
N-RNA-NE	12 p. cent	6	2.120	6.450

* Après l'injection du $^{32}PO_4$.

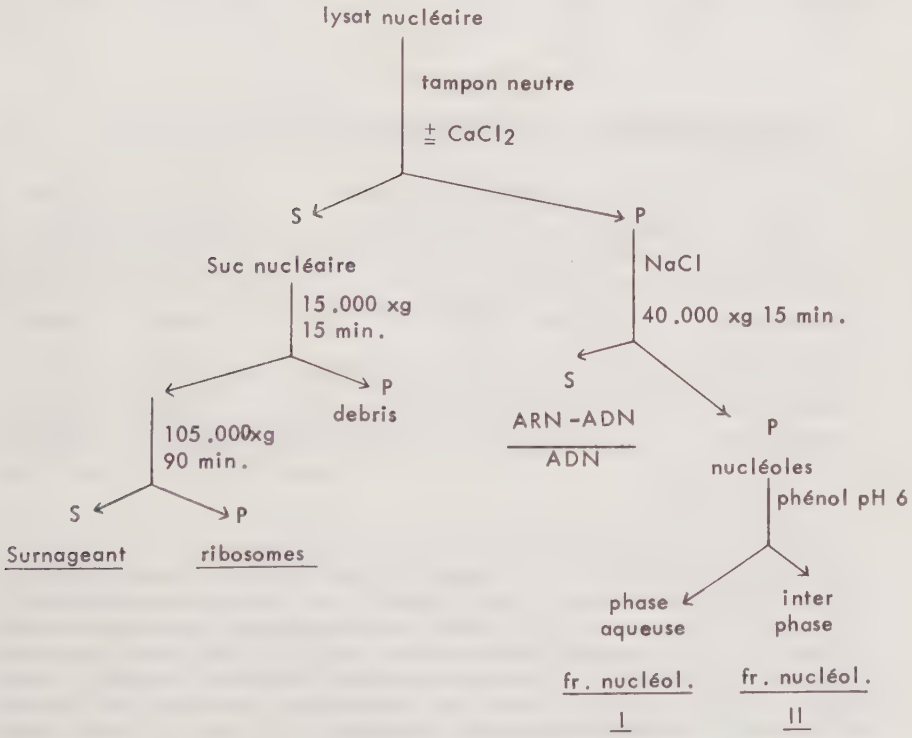
réalisées. La répartition quantitative des ARN dans ces fractions est différente de celle indiquée par GEORGIEV et COLL (1961). La distribution que nous avons trouvée est peut-être caractéristiques des noyaux rénaux. Cependant, dans nos essais, l'incorporation du $^{32}PO_4$ est la plus forte dans le NS-RNA alors que le N-RNA-NE a toujours l'activité la plus faible. Ceci est en désaccord absolu avec les résultats de GEORGIEV. Ces auteurs ont d'ailleurs rapidement abandonné cette méthode pour revenir à une technique dérivée de celle d'ALLFREY et MIRSKY que nous avons décrit plus haut (GEORGIEV et SAMARINA, 1961).

Le grand intérêt du fractionnement phénolique, comme nous le montrerons, est de mettre en évidence l'existence d'ARN très labile qui ne peut être extrait facilement par le phénol. Dans nos essais un autre facteur important apparaît. Nous avons, en effet, utilisé un appareil type "Virtis" pour broyer les noyaux à la vitesse de 30.000 tours/minute. Ce traitement brise effectivement la membrane nucléaire et améliore l'action du phénol, mais il détruit également la structure de l'appareil nucléolochromosomique et libère dans le suc nucléaire l'ARN très radioactif N-RNA NE. Ces faits, qui ont été confirmés par SIBATANI et COLL (1962) suffisent à expliquer notre distribution des divers ARN et montrent la nécessité absolue d'éviter tout traitement brutal des noyaux.

L'incertitude quant à la nature des fractions isolées par la méthode de GEORGIEV et les résultats peu encourageants que nous avons observés quant à la localisation possible de l'effet de la nicotinamide, nous ont fait rechercher une technique plus adéquate. La synthèse entre les deux types de méthodes précédentes permet d'obtenir un fractionnement satisfaisant. La figure 7 schématise le

FIGURE 7

SCHEMA DU FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE



mode opératoire que nous avons adopté. L'extraction du suc nucléique est d'abord réalisée avec un tampon Tris-$CaCl_2$; ensuite les acides nucléiques chromosomiques sont solubilisées dans le Na Cl 1M; enfin, le résidu formé par les nucléoles est traité par le phénol pH 6,0 contre un tampon phosphate: on sépare ainsi l'ARN de la phase aqueuse d'un ARN qui reste dans la phase phénolique. Cette méthode a été récemment décrite par SIBATANI et COLL (1962) mais nous y avons apporté quelques modifications.

Nous avons d'abord remplacé le broyage des noyaux par une homogénéisation dans un appareil de type POTTER (WEILL, 1958) dans une solution très hypotonique. Le choc osmotique suffit alors à faire éclater les membranes du noyau. Les noyaux lysés sont à nouveau homogénéisés dans le tampon Tris-HCl (pH 7,4) 0,5 M-$CaCl_2$ 0,003 M. L'opération est répétée deux fois. La centrifugation à 1.000 g pendant 15 minutes permet de séparer le suc nucléaire. L'utilisation du tampon ci-dessus nous a donné des résultats nettement supérieurs à ceux obtenus avec le KCl (GEORGIEV et SAMARINA, 1961) ou un tampon Tris 0,1 M (SIBATANI et COLL, 1962).

Le suc nucléaire ainsi obtenu contient plusieurs types d'ARN: des particules ribonucléoprotéiques correspondant aux ribosomes cytoplasmiques et de l'ARN soluble (FRENSTER et COLL, 1960; GEORGIEV et SAMARINA, 1961). Un fractionnement complémentaire est donc nécessaire. Dans la plupart des expériences, nous avons séparé par ultracentrifugation à 105.000 g pendant 90 minutes les particules nucléoprotéiques (ribosomes) de la fraction surnageante (Surn.). Le tableau 13 indique la quantité relative d'ARN dans ces deux compartiments

TABLEAU 13

FRACTIONNEMENT DE L'ARN NUCLEAIRE DU REIN DE RAT

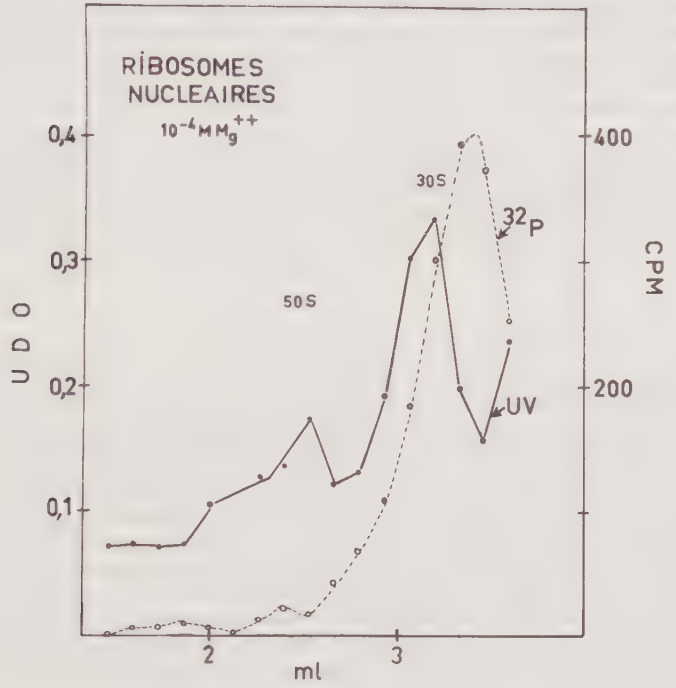
Fraction	Pourcentage de l'ARN nucléaire	Appellation d'Allfrey et Mirsky	Activ. spécif. ARN cpm / µM nucleot. 1 heure*	2 h. 30 min.*
Surnageant	18 p. cent	46 p. cent RNA I	16.110	72.800
Ribosomes	28 p. cent		19.350	26.510
ARN - ADN	36 p. cent	36 p. cent RNA II	4.320	51.000
Nucléolaire I	9 p. cent	18 p. cent RNA III	7.205	38.020
Nucléolaire II	9 p. cent		74.220	166.530

* Après l'injection du $^{32}PO_4$.

nucléaires. Dans certains cas nous avons utilisé une méthode différente. Afin de purifier au maximum les particules ribosomiales des autres ARN qui pourraient y être liés, nous les avons soumises à une ultracentrifugation dans un gradient de saccharose selon la technique développée par GROS et COLL (1961) (figure 8). Cette méthode confirme qu'à côté des ribosomes nucléaires, il existe de l'ARN de plus faible poids moléculaire et de métabolisme plus intense. Par analogie avec les expériences sur les bactéries (GROS et COLL, 1961) on peut supposer l'existence d'ARN messager.

FIGURE 8

SEDIMENTATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE DES RIBOSOMES NUCLEAIRES



Le résidu nucléaire, après le traitement par le tampon neutre, est agité toute une nuit dans le Cl Na 1M. Une portion assez considérable d'ARN est solubilisé en même temps que l'ADN. Les nucléoles sont traités par le phénol et l'ARN nucléolaire I passe dans la phase aqueuse. Mais 5-10% de l'ARN nucléolaire reste dans la phase phénolique : ARN nucléolaire II.

Le tableau 13 montre également l'incorporation de phosphore radioactif dans l'ARN de ces différentes fractions. C'est l'ARN nucléolaire II qui présente l'activité spécifique la plus élevée. L'ARN de la fraction surnageante du suc nucléaire montre également une activité élevée qui dépasse largement celle des particules ribonucléoprotéiques.

Ces résultats sont en accord avec les données rapportées par MIRSKY et OSAWA (1961) quant à la répartition des ARN nucléaires du rein. 50% environ se trouve dans le suc nucléaire, 30% dans la fraction chronosomique liée à l'ADN et 20% dans le nucléole. Nous avons également trouvé dans le nucléole l'ARN labile décrit par SIBATANI et COLL (1962) et par GEORGIEV et COLL (1962). Ces auteurs ont montré que cet ARN pouvait être extrait de la phase phénolique de KIRBY (1956) que par un traitement par l'eau distillée ou par chauffage à 60°C. Cet ARN peut également être extrait partiellement par le dodecyl sulfate de Na comme nous l'indiquerons plus loin, et comme HIATT (1962) l'a récemment montré. Les propriétés évoquées indiquent que ce composé présente une

structure physico-chimiqueproche de celle de l'ADN dont la préparation par le phénol répond aux mêmes conditions (COLTER et COLL, 1962). La composition en base de l'ARN nucléolaire II décrit par les auteurs mentionnés est, de plus, voisine de celle de l'ADN. Il pourrait s'agir d'un ADN qui jouerait dans la cellule animale le rôle de l'ARN messager chez les bactéries et chez les phages (JACOB et MONOD, 1961). Rappelons que l'ARN messager possède une structure secondaire assez proche de celle du modèle de WATSON et CRICK (1953) pour l'ADN (GEIDUSHEK, MOOHR et WEISS, 1952) et reproduit la séquence nucléotidique des chaînes de l'ADN (SPIEGELMANN et COLL, 1961).

La technique de fractionnement que nous venons de décrire nous a permis d'étudier le métabolisme des ARN des divers compartiments nucléaires et l'action de la nicotinamide sur chacun d'entre eux tant in vivo que in vitro. Dans la partie de notre thèse consacrée aux expériences sur les noyaux isolés, nous reviendrons donc sur les résultats principaux de cette méthode.

b) FRACTIONNEMENT DE L'ARN NUCLEAIRE

Cette seconde conception est basée sur une séparation des ARN suivant leurs propriétés physico-chimiques. De nombreuses techniques existent déjà, bien que la biologie moléculaire soit une science jeune; mais nous nous limiterons à la discussion de celles qui sont appliquables à la cellule animale.

La première étape consiste à isoler l'ARN du tissu en respectant deux prinpes: obtenir à l'état pur tous les ARN présents et ne pas les dégrader durant le processus d'extraction. Il est donc impossible d'utiliser les méthodes de SCHNEIDER (1945) ou de SCHMIDT et TANNHAUSER (1945) qui reposent sur l'hydrolyse de l'ARN. La méthode au chlorhydrate de guanidine privitivement proposée par VOLKIN et CARTER (1951) a été remplaçée récemment par la technique au phénol de KIRBY (1956). Celle-ci permet d'obtenir la séparation de l'ARN de son support protéique et aurait eu selon son auteur l'avantage de bloquer dès le début du traitement toute action de la RNase.

Des préparations d'ARN ainsi réalisées se sont vite avérées hétérogènes, tant à l'examen physique que chimique. Des études de solubilité, de sédimentation, de viscosité ont montré que le poids moléculaire était différent d'un type d'acide nucléique à l'autre. La composition en nucléotides est elle aussi variable. Les progrès récents de la biochimie moléculaire ont permis de montrer dans la cellule vivante l'existence de 3 types d'ARN: transfert ou soluble, ribosomique et enfin "messager". Ils diffèrent par leur solubilité: le Cl Na 2M ou le sulfate de streptomycine précipitent l'ARN ribosomique et laisse l'ARN transfert en solution (HARSHAW, BROWN et GRAHAM, 1962). L'ultracentrifugation dans le Cl Cs à la Spinco analytique ou dans un gradient de saccharose (GROS et COLL, 1961) a permis la première séparation simultanée de ces trois ARN. L'acide ribonucléique ribosomique est lui-même différencié en deux constituants de coefficients de sédimentation voisins (16 S et 23 S dans la cellule bactérienne; 20 S et 30 S dans la cellule animale (KURLAND, 1960; HALL et DOTY, 1959). Pour l'ARN soluble, ce coefficient est 4 S (TISSIERES, 1959). Celui de l'ARN messager est encore controversé, les données de la littérature allant de 8 à 40 S pour les bactéries et pour les tissus animaux (MONIER et COLL, 1962; HIATT, 1962). L'électrophorèse sur cellulose permet d'intéressants fractionnements (ROTMAN et SPIEGELMANN, 1954), et récemment des techniques chromatographiques ont été mises au point: sur gel de Dextranne (SEPHADEX) (DIRHEIMER, WEIL et EBEL, 1962), sur DFAE-cellulose (OTAKA et COLL. 1962a) ou sur kieselguhr - albumine méthylée (MANDELL et HERSHEY, 1960).

Comme il ressort de travaux récents, l'acide ribonucléique nucléaire est, lui aussi, formé de ces trois types d'ARN. La première étude détaillée de ce genre est à attribuer à HIATT (1962). Par la sédimentation des ARN nucléaires du foie il montre l'existence d'ARN transfert 4 S, d'ARN ribosomique 20 S et 30 S et d'un ARN labile de coefficient de sédimentation supérieur à 30 S. Ces résultats confirment ceux obtenus par CHENG (1959) et par GEORGIEV et SAMARINA (1961).

Notre travail dans ce domaine est contemporain de celui des auteurs cités plus haut puisqu'il a été réalisé de septembre 1961 à juillet 1962. Nous avons utilisé principalement: la chromatographie sur colonne de sérum albumine méthylée kieselguhr et la sédimentation en gradient de saccharose. Nous décrirons successivement la préparation de l'ARN nucléaire et les résultats obtenus avec les techniques de fractionnement.

1. PREPARATION DE L'ARN NUCLEAIRE

Nous avons adopté une méthode dérivée de celle de KIRBY (1956); le traitement décrit par cet auteur ne permet de faire dans la phase aqueuse qu'une quantité limitée de l'ARN nucléaire (voir tableau 12). L'ARN associé à l'ADN ne peut être extrait que par le phénol à pH 8,3 et il reste même après cette seconde extraction environ 10% d'ARN dans le résidu protéique. L'addition d'un détergent tel que le dodécyl sulfate de sodium permet de faire passer dans la phase aqueuse jusqu'à 90% des acides nucléiques du noyau, mais comme l'ADN est 10 fois plus abondant que l'ARN une étude de l'ARN est impossible dans un tel échantillon. Le traitement à la DNAse suivi d'une précipitation par l'alcool (60% v/v) permet d'obtenir une préparation d'ARN qui ne contient plus ni ADN, ni protéines. Par contre, une certaine proportion d'oligodesoxynucléotides sont insolubles dans l'alcool. Leur présence peut gêner considérablement la sédimentation de l'ARN nucléaire dans un gradient de saccharose. Au contraire, la colonne d'albumine méthylée n'absorbe que l'ARN et les oligodesoxyribonucléotides se retrouvent dans le liquide effluant.

Les nucléases risquent de dépolymeriser l'ARN au cours de la préparation. Le dodécyl sulfate de Na à 1% et le traitement phénolique ne permettent pas à eux seuls d'éviter l'action de la RNase. Nous avons préféré ajouter de la bentonite qui est connu comme un puissant inhibiteur de la RNase (BROWNHILL, 1959). Il faut également veiller à ne pas utiliser une DNase qui soit souillée par le RNase.

La méthode de purification que nous avons utilisée est très voisine de celle de HIATT (1962). L'utilité du lauryl sulfate de Na ressort nettement des travaux de KURLAND (1960), de SIBATANI et COLL (1962) et de MONIER (1962). La technique préconisée par SCHERRER et COLL (1962) utilise le phénol à 60°C pendant un temps de contact très court: dans ces conditions, l'ADN reste dans la phase phénolique. Bien que du point de vue théorique cette méthode soit plus satisfaisante, il faut remarquer que ces auteurs ont opéré sur le tissu entier dans lequel le rapport ADN/ARN est beaucoup plus faible que dans le noyau. D'autre part, le chauffage risque de provoquer une dénaturation importante de l'ARN (HALL et DOTY, 1959).

2. CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN NUCLEAIRE

Cette méthode est dérivée de celle décrite d'abord par LERMANN (1955), puis par MANDELL et HERSHEY (1960). Elle a été utilisée pour l'étude de l'ADN (LERMANN, 1955; HERSHEY et BURGI, 1960; SUEOKA et COLL, 1962) et ensuite pour celle de l'ARN bactérien (SUEOKA et COLL, 1962; OTAKA et COLL 1962; KUBINSKI et COLL, 1962; MONIER et COLL, 1962). La chromatographie sur kieselguhr-albumine méthylée permet un fractionnement des ARN non seulement selon leur poids moléculaire mais aussi selon leur composition en nucléotides (MONIER et COLL, 1962). Comme nous l'avons dit, la difficulté principale dans l'étude des ARN du noyau cellulaire est l'énorme quantité d'ADN présente. Contrairement à l'ultracentrifugation, la chromatographie effectue la séparation entre les ARN et les restes des chaînes ADN après la digestion DNasique.

Nous avons adopté la méthode de MANDELL et HERSHEY (1960) pour l'étude des ARN de la cellule animale. Les détails techniques ont été présentés dans la partie de cette thèse réservée à l'exposé des méthodes. Rappelons que nous avons utilisé une couche homogène de kieselguhr-albumine méthylée et non pas les trois couches superposées décrites dans la technique originale. D'autre part, l'élution a été réalisée par un gradient exponentiel de NaCl (0,1-1M) et de pH (Tris 0,02M pH 7,0 - Tris 0,02M pH 9,7). L'utilisation d'un gradient de pH en plus du gradient salin permet d'éluer plus quantitativement les ARN adsorbés sur la colonne. Il est nécessaire de surveiller la température et la vitesse d'élution qui modifient beaucoup le chromatogramme (KUBINSKI et COLL, 1962). Nous avons élué, soit à la vitesse de 45ml/h, soit de 30ml/h.

Ne disposant pas d'une ultracentrifugeuse analytique et afin de pouvoir interpréter les résultats de la chromatographie de l'ARN nucléaire rénal, nous avons d'abord étudié l'ARN des ribosomes, obtenus par un traitement au desoxycholate (PALADE et COLL. 1956) de la fraction microsomiale du foie de rat. On sait, en effet que dans les ribosomes provenant de l'esgastoplasme des cellules de mammifères, on trouve deux ARN de haut poids moléculaire, dont la constante de sédimentation est respectivement de 18 - 20 S et de 28 - 30 S (GIERER, 1958; HALL et DOTY, 1959). La figure 9 montre que dans notre préparation on peut séparer trois types d'ARN: deux ARN de haut poids moléculaire qui correspondrait au 20 S et 30 S et un ARN de faible masse que l'on peut identifier à l'ARN soluble qui se trouve associé aux particules ribonucléoprotéiques (MIRSKY et OSAWA, 1961). Le fractionnement obtenu est très voisin de celui décrit par OTAKA et COLL, (1962) pour la cellule bactérienne.

La chromatographie des ARN nucléaires rénaux confirme ces données. La courbe de densite optique des chromatogrammes (figure 10) permet de distinguer les trois fractions d'ARN évoquées que nous identifions par comparaison avec les ARN des ribosomes. Dans le noyau des cellules rénales, la fraction 20 S est plus abondante que la fraction 30 S, alors que si on étudie les ARN de l'ensemble de la cellule rénale, c'est l'ARN 30 S qui est le plus abondant (figure 16). Dans les noyaux des cellules hépatiques, c'est également cette fraction 30 S qui prédomine (P. MANDEL, non publié). Nous avons pu montrer, en chromatographiant separement les fractions subnucléaires que l'ARN lourd avait une origine surtout nucleolaire. La figure 11 montre que le nucléole fournit principalement de l'ARN 30 S et une certaine quantité d'ARN 18 - 20 S. Au contraire, dans le suc nucléaire, c'est l'ARN 20 S qui prédomine nettement.

FIGURE 9

CHROMATOGRAPHIE SUR ALBUMINE METHYLEE DE L'ARN DES RIBOSOMES DU FOIE

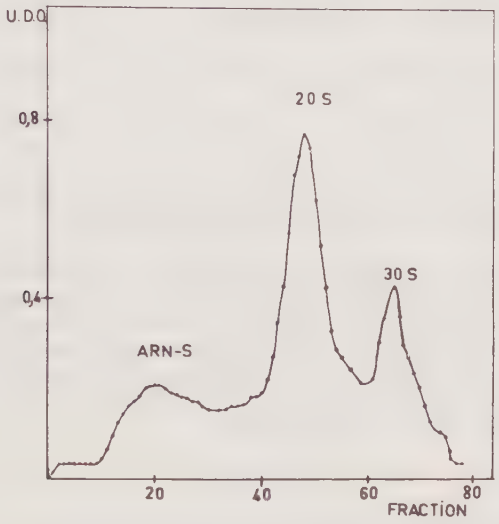
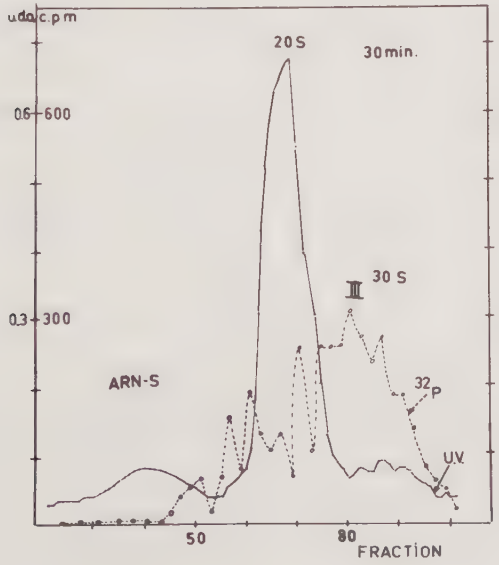


FIGURE 10

CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN NUCLEAIRE RENAL

30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$



La répartition des ARN 20 S et 30 S dans le noyau est donc une indication de l'importance relative des divers compartiments nucléaires. Il convient de noter à cet égard que MIRSKY et OSAWA (1961) rapportent des différences importantes entre les noyaux des cellules hépatiques et rénales quant à la répartition de l'ARN des trois fractions: suc nucléaire: ARN I, chromosomes: ARN II et nucléoles: ARN III. Le pourçentage s'établit ainsi:

	ARN I	ARN II	ARN III	
Rein	50	30	20	%
Foie	22	22	56	%

On peut donc prévoir que le foie contient beaucoup plus d'ARN nucléaire 30 S que le rein, ce qui est confirmé dans nos expériences.

La méthode chromatographique ne fractionne pas les ARN selon leur poids moléculaire uniquement; la composition chimique intervient également. La certitude quant à la constante de sédimentation réelle des ARN nécessite donc une mesure directe de la vitesse de sédimentation dans une ultracentrifugeuse analytique. Nous ne disposons pas de cette installation, néanmoins, la centrifugation sur gradient de saccharose (GROS et COLL, 1961) confirme, comme nous le verrons, les résultats de la chromatographie.

FIGURE 11

CHROMATOGRAPHIES DES ARN DU SUC NUCLEAIRE ET DU NUCLEOLE DU REIN

2 h. 30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$

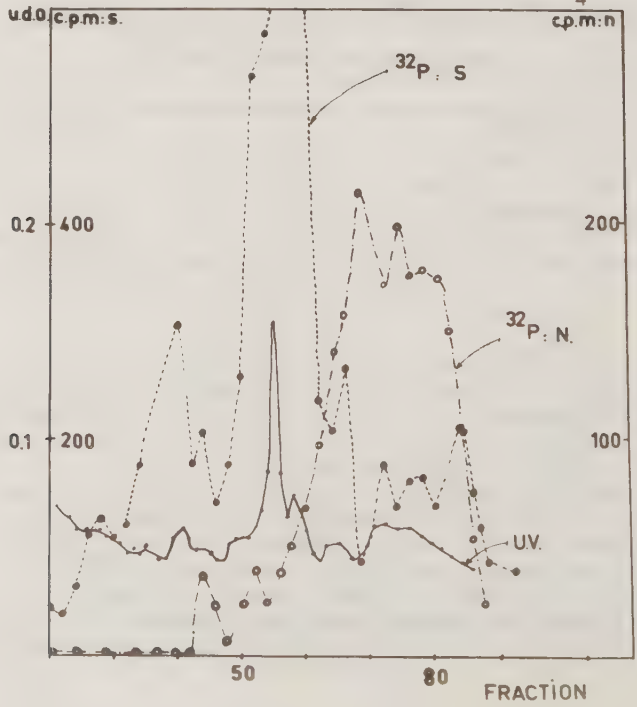
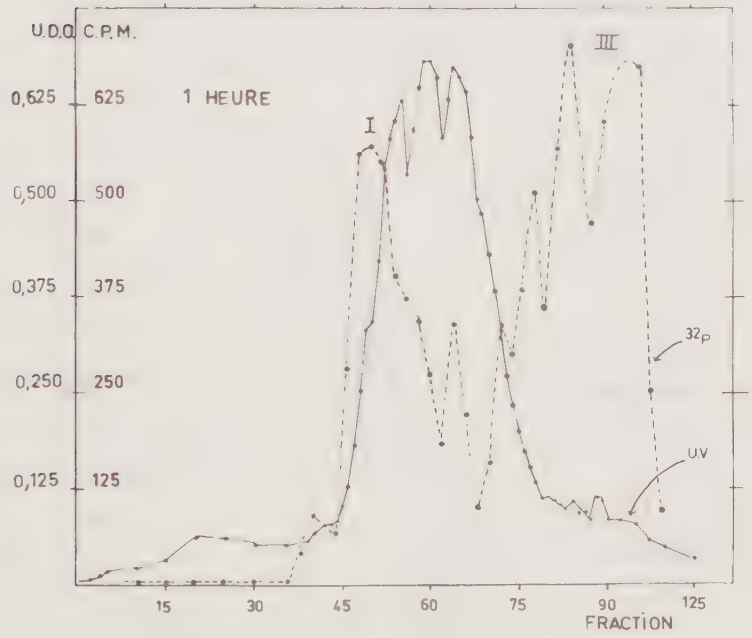


FIGURE 12

CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN NUCLEAIRE DU REIN

1 heure après l'administration du $^{32}PO_4$



Nous avons étudié l'incorporation du phosphate radioactif dans les diverses fractions d'ARN nucléaire en fonction du temps. Le tracé de la radioactivité 30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$ (figure 10) indique une activité spécifique élevée de l'ARN 30 S (Fr. III) par rapport aux autres ARN. Au délai d'une heure, la radioactivité est incorporée dans deux fractions qui se situent dans le tracé d'élution l'une avant l'ARN 20 S (Fr. I) et l'autre sur l'ARN 30 S (Fr. III). Le pic d'ARN ribosomique 20 S a une activité faible (figure 12). 2 heures 30 min. après l'administration du ^{32}P, l'ARN 20 S est marqué à son tour par l'isotope (figures 13, 14). Enfin, après 7 heures l'activité spécifique de l'ARN 20 S est multipliée par 3, mais celle de la fraction III ne diminue pas.

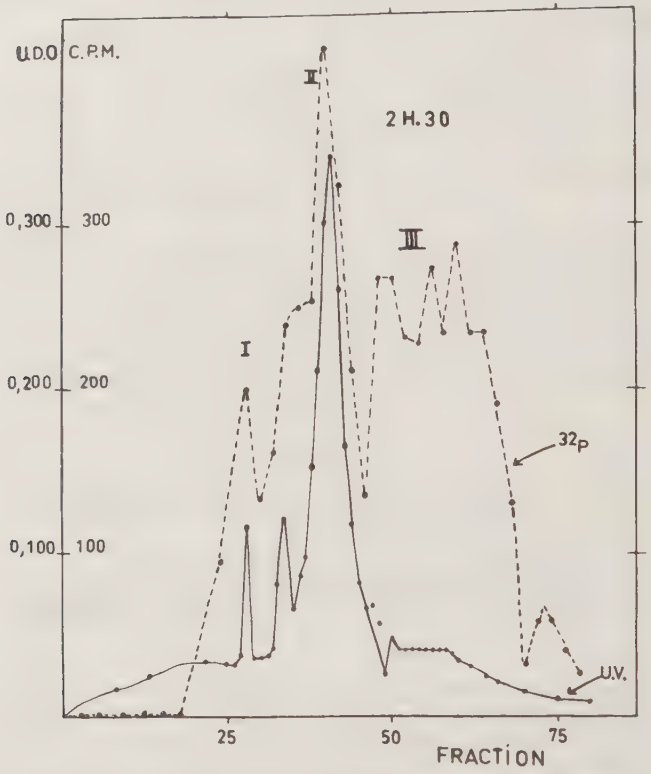
La répartition du phosphate radioactif dans les ARN ribosomiques 20 S et 30 S de la cellule rénale, après un délai de 24 heures montre que l'activité spécifique est la même dans les deux fractions (figure 16).

Que représente l'apparition dès la première heure des ARN radioactifs I et III sur le chromatogramme? S'agit-il du début du marquage des ARN ribosomiques ou d'un ARN différent qui s'élue en même temps qu'eux? Pour distinguer entre ces deux hypothèses, nous avons bloqué après un temps bref de 30 minutes l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN en injectant une quantité importante de phosphate non radioactif. Les animaux sont sacrifiés 2 heures 30 minutes après le début de l'expérience, soit dans les mêmes conditions que dans la figure 13. On

FIGURE 13

CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN NUCLEAIRE DU REIN

2 h. 30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$



constate, figure 15, que dans ces conditions, l'ARN ribosomique 20 S ne se marque pas. Tenant compte des données cinétiques ci-dessus, ceci montre que l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN ribosomique n'est pas encore commencée 30 minutes après l'injection de l'isotope et que les ARN labiles (Fr. I et III) ne sont pas les précurseurs des ARN ribosomiques. S'il en était ainsi, la dilution du pool du phosphate minéral ne devrait pas influencer le marquage de ces ARN à partir d'un précurseur déjà radioactif. On doit donc conclure à une autonomie métabolique des ARN labiles, qui représentent un type d'ARN différent du ribosomique.

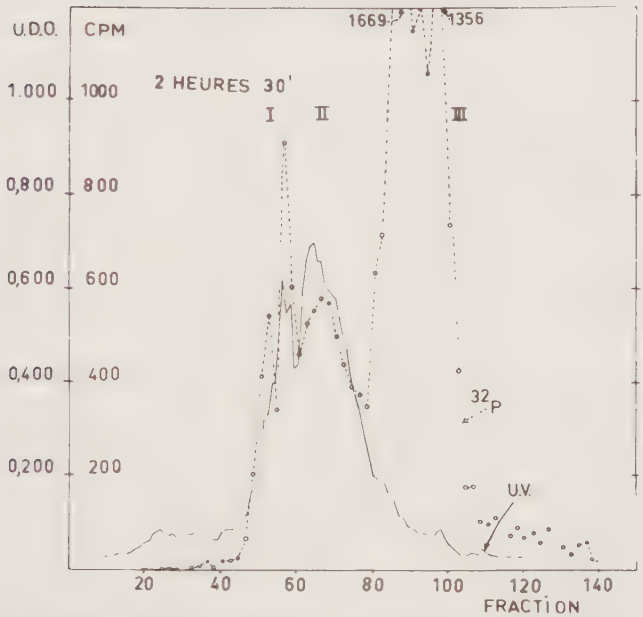
L'identification de ces fractions labiles est évidemment un problème important. Il faut noter d'abord que la fraction radioactive I représente une partie nettement individualisée du pic d'ARN ribosomique 20 S comme le montre les chromatographies réalisées avec une vitesse d'élution de 30ml/heure (fig. 14). La faible teneur des noyaux rénaux en ARN 30 S rend difficile la localisation précise de la fraction radioactive III. Mais on peut la situer par analogie avec les cellules bactériennes, où il existe également des fractions d'ARN labile séparées des ARN ribosomiques (OTAKA et COLL, 1962; MONIER et COLL,

FIGURE 14

CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN NUCLEAIRE DU REIN

2 h. 30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$

(élution à 30 ml/h.)



1962). La chromatographie sur albumine méthylée montre que l'une se situe avant l'ARN ribosomique 16 S et correspond donc à notre fraction I. Les deux autres s'éluent comme l'ARN 23 S, l'une légèrement avant, l'autre légèrement après. Nous assistons presque toujours au dédoublement de la fraction radioactive III (figures 12-15) et les chromatogrammes que nous avons obtenus sont donc voisins de ceux des ARN bactériens. ISHIHAMA et COLL. (1962) ainsi que MONIER et et COLL, (1962) ont réussi à démontrer le caractère messager de la fraction III: elle se fixe sur les ribosomes 30 S et 50 S et est capable de stimuler l'incorporation des acides aminés dans un système ribosomique adéquat. Nous avons, nous aussi, recherché les caractères de type messager de l'ARN labile; ces expériences seront partiellement décrites au chapitre consacré à l'étude in vitro des noyaux cellulaires.

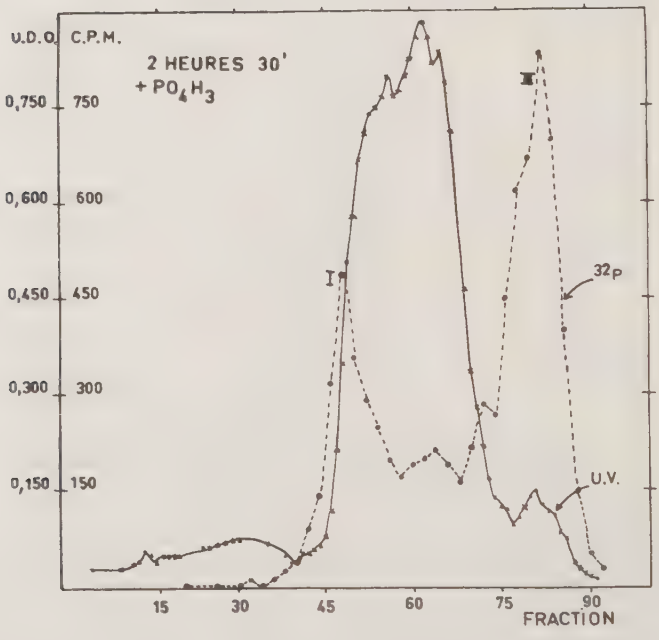
Les fractions radioactives labiles que met en évidence la chromatographie ne semblent pas avoir un renouvellement rapide. Ni l'injection de phosphate minéral non radioactif, ni l'allongement du délai entre l'injection de l'isotope et le sacrifice ne font disparaître la fraction III. Cette lenteur de renouvellement semble en contradiction avec la rapidité du marquage et le terme "labile" serait impropre. Ceci s'explique si on admet qu'il s'agit d'un ARN messager synthétisé de novo en une seule pièce sur le moule ADN à partir des nucléosides triphosphates avec l'ARN polymérase (WEISS, 1960). L'activité maximum est atteint d'emblée dans ce cas. Au contraire l'ARN ribosomique n'incorporerait l'isotope que lentement par un renouvellement partiel des chaînes nucléotidiques.

FIGURE 15

CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN NUCLEAIRE DU REIN

2 h. 30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$

2 h. avant le sacrifice, l'animal reçoit 25 mg de PO_4 non radioactif



Cette labilité de la fraction III ne préjuge en rien de sa vitesse de renouvellement. La lenteur de celui-ci semble être une caractéristique des tissus animaux, comme celà apparaît dans le cas des reticulocytes (NATHANS et COLL. 1962) où dans les expériences de régénération hépatique (BUSCH et COLL, 1962).

3. SEDIMENTATION DE L'ARN NUCLEAIRE

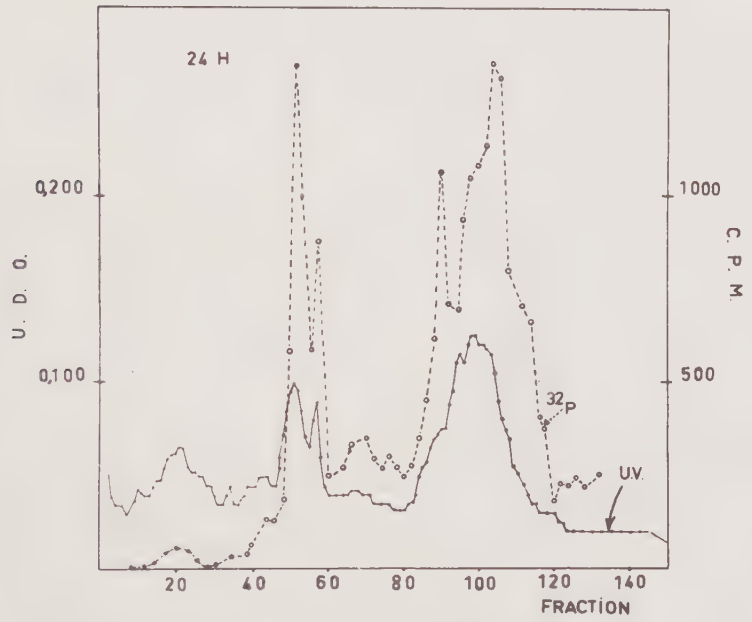
Ainsi que nous l'avons fait pour la chromatographie, nous avons d'abord étudié le diagramme de sédimentation des ARN préparés à partir de ribosomes purifiés de foie de rat. Nous avons utilisé un gradient de saccharose de 12,5 à 30%. La centrifugation a été faite dans le rotor Spinco SW 39 à 37.000 t/min. pendant 14 heures. Le diagramme obtenu montre la présence des ARN 4 S, 20 S et 30 S (figure 17).

FIGURE 16

CHROMATOGRAPHIE DE L'ARN DU REIN

24 heures après l'injection du $^{32}PO_4$

(élution: 30 ml/h.)



La plus grande partie de l'ARN nucléaire du rein sédimente comme l'ARN 20 S. Les deux autres types d'ARN se trouvent en quantité limitée (figure 18 a). Ceci est en plein accord avec les résultats de la chromatographie. L'ARN marqué par le $^{32}PO_4$ une heure après l'injection de l'isotope sédimente plus vite que l'ARN 20 S mais moins vite que le 30 S (figure 18 a). Dans les mêmes conditions rappelons que la chromatographie nous a montré l'existence d'une fraction très radioactive qui se superpose sur le chromatogramme à l'ARN 30 S. Cette différence entre l'ultracentrifugation et la chromatographie s'explique si on se souvient que la colonne de kieselguhr-albumine méthylée retient les acides nucléiques selon leur poids moléculaire mais aussi selon leur composition en nucléotides. MONIER et COLL (1962) ont observé les mêmes différences entre les données de la chromatographie et celles de l'ultracentrifugation.

HIATT (1962) par la même technique avec des préparations d'ARN de foie obtenues par une méthode très voisine de la nôtre, a pû montrer l'existence d'un ARN labile de constante de sédimentation supérieure à 30 S. Cet ARN n'est observé que si l'isotope est injecté pendant un très bref délai avant le sacrifice des animaux. A des délais supérieurs à 40 minutes, l'ARN labile sédimente dans la zône des ARN ribosomiques.

FIGURE 17

SEDIMENTATION DE L'ARN DE RIBOSOMES DU FOIE

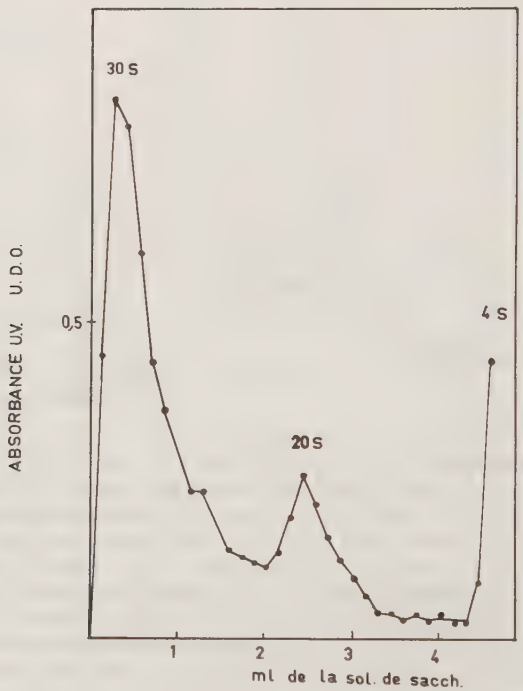
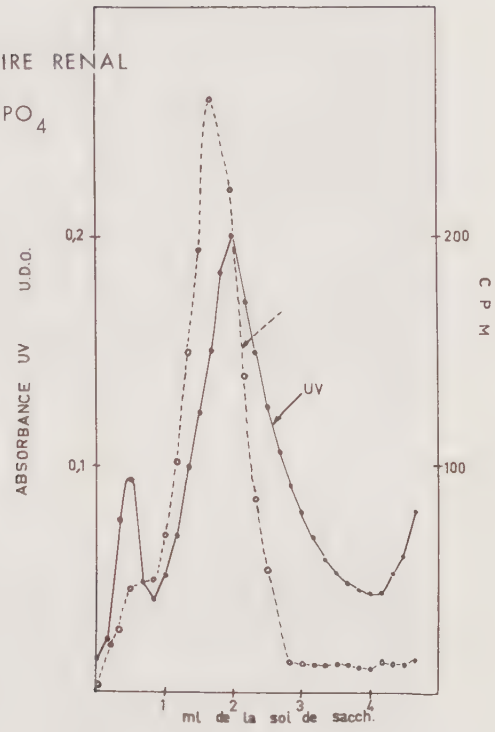


FIGURE 18a

SEDIMENTATION DE L'ARN NUCLEAIRE RENAL

1 heure après l'injection de $^{32}PO_4$



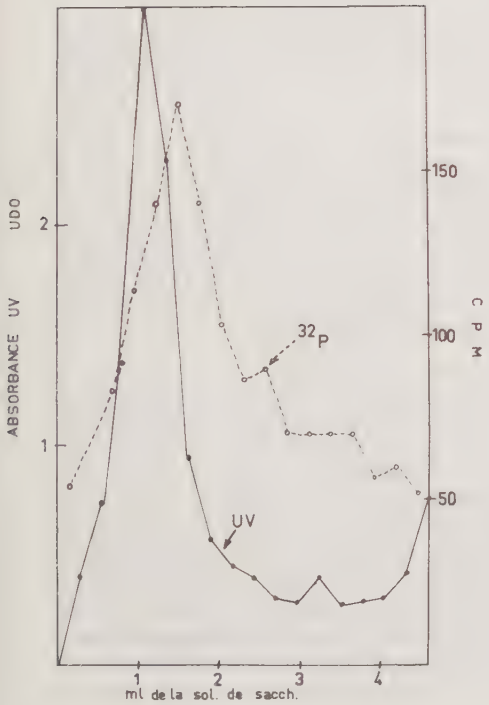


FIGURE 18b

SEDIMENTATION

DE LA FRACTION ARN - ADN

30 min. après l'injection de $^{32}PO_4$

Nous avons étudié également l'ARN lié à l'ADN qui existe dans le noyau cellulaire. En effet, quand on extrait l'ADN de l'appareil nucléochromosomique soit par le Na Cl 1M (SIBATANI et COLL, 1962), soit par le phénol alcalin (GEORGIEV et COLL, 1961), on entraîne une importante fraction d'ARN. Nous avons préparé cette fraction à partir de noyaux de rein, 30 minutes après l'injection de $^{32}PO_4H_2$. On sait que dans la cellule rénale l'ADN n'incorpore pas l'isotope avant un délai de 15 jours, ce tissu ne présentant pas de multiplications cellulaires. Dans ces conditions sur le diagramme de sédimentation de l'ARN - ADN, le tracé de l'absorption dans l'UV repère l'ADN qui se trouve en quantité 30 fois supérieure à l'ARN. La radioactivité repère l'ARN. On constate (figure 18b) que la majeure partie de la radioactivité sédimente avec l'ADN et apparaît donc lié physiquement aux molécules d'ADN. Une sédimentation dans un gradient de Cl Cs 9M, pendant 48 heures dans les mêmes conditions, qui permet une séparation excellente entre l'ADN et l'ARN, indique également l'existence d'une fraction d'ARN radioactif qui sédimente avec l'ADN.

c) CONCLUSIONS

Les conclusions les plus importantes sont celles que l'on peut tirer des expériences qui allient les deux grands types de fractionnement décrits: analyse par chromatographie ou ultracentrifugation des ARN et étude des compartiments subnucléaires.

Nous avons vu que le suc nucléaire contient essentiellement de l'ARN ribosomique 20 S et en plus faible quantité les ARN 30 S et 4 S. Ceci est en accord avec les observations de GEORGIEV et SAMARINA (1961) qui ont montré que dans le noyau des cellules hépatiques le suc nucléaire est formé de ribosomes contenant surtout de l'ARN de haut poids moléculaire et d'un liquide surnageant contenant essentiellement de l'ARN de faible masse. Dans le rein nous avons également pû séparer ces deux constituants par centrifugation à 105.000 g (tableau 13). Il est à noter que l'activité spécifique de l'ARN provenant des ribosomes ainsi préparés est supérieure à celle de l'ARN ribosomique isolé par la colonne de Kieselguhr-albumine méthylée. Ceci indique que les ribosomes contiennent encore, en plus de l'ARN ribosomique, des ARN qui incorporent plus rapidement le $^{32}PO_4$. Ceci est confirmé si on purifie les particules ribonucléoprotéiques par sédimentation dans un gradient de saccharose (figure 8).

L'appareil nucléolochromosomique peut être fractionné lui aussi. L'extraction par le ClNa M fournit l'ARN lié à l'ADN. La nature de cette fraction reste obscure. RHO et BONNER (1961) ont montré que dans les noyaux des cellules végétales, la synthèse de l'ARN semblait se faire d'abord dans le compartiment chromosomique. Des expériences préliminaires (SIBATANI et COLL, 1962), indiquent que dans la cellule hépatique, l'ARN le plus radioactif se trouve dans la fraction liée à l'ADN. La découverte de l'ARN polymérase qui nécessite la la présence d'ADN pour fabriquer des ARN spécifiques, est un argument important en faveur de cette hypothèse (WEISS, 1960). Les travaux de SPIEGELMANN (YANKOFSKY et SPIEGELMANN, 1962) sur les hybrides ARN - ADN dans la cellule bactérienne confirment encore cette manière de voir. Dans nos conditions, la fraction ARN liée à l'ADN n'est pas la plus radioactive, mais la présence d'hybrides ARN - ADN est vraisemblable.

Le résidu nucléaire, après extraction de l'ADN, est formé par les nucléoles (ALLFREY et MIRSKY, 1957). Nous avons pû montrer que le nucléole contient deux types d'ARN : par le traitement au phénol pH 6,0 à température ordinaire, l'un se trouve dans la phase aqueuse (nucléolaire I), l'autre dans la phase phénolique (nucléolaire II). L'incorporation du $^{32}PO_4H_2$ est beaucoup plus rapide dans l'ARN nucléolaire II (tableau 13). La chromatographie des ARN nucléaires préparés par la méthode au phénol en présence de dodécyl sulfate de Na (traitement qui permet d'obtenir à la fois des ARN nucléolaires I et II tout en laissant, cependant, une certaine quantité d'ARN liée aux protéines nucléolaires) montre deux fractions. La principale correspond à l'ARN labile30 S, l'autre à l'ARN ribosomique 18 - 20 S. La chromatographie de l'ARN nucléolaire I donne une seule fraction qui se situe sur le diagramme d'élution à la place de l'ARN ribosomique 18 - 20 S. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de GEORGIEV (1961) qui a trouvé, dans l'ensemble de l'appareil nucléolochromosomique deux types d'ARN de haut poids moléculaire respectivement 20 et 30 S. Comme dans le nucléole isolé nous trouvons aussi ces deux ARN, il en découle que les ARN liés à l'ADN sont du même type que ceux présents dans le nucléole.

En ce qui concerne la composition chimique, SIBATANI et COLL (1962), ainsi que GEORGIEV et COLL (1962) ont montré dans les noyaux des cellules hépatiques que la composition en nucléotides de l'ARN nucléolaire I est semblable à celle de l'ARN ribosomique, alors que celle de l'ARN nucléolaire II qui serait l'ARN messager, correspond à la constitution de l'ADN. La présence dans le nucléole de cet ARN messager confirme encore l'hypothèse de l'origine chromosomique de l'ARN que nous avons évoquée plus haut. L'ARN synthétisé sur la matrice désoxyribonucléique serait accumulé et organisé dans le nucléole, qu'il s'agisse d'ARN messager, d'ARN ribosomique ou même de la chaîne endonucléotidique de l'ARN soluble dont la présence a démontrée par VINCENT (1957) (MERITS, 1963).

Le nucléole montre à l'observation microscopique qu'il est formé d'un assemblage de particules nucléoprotéiques pour lesquelles le terme nucléolonème a été proposé(GEORGIEV et CHENTSOV, 1962). C'est dans le nucléole que la structure du ribosome serait acquise par l'assemblage de la partie protéique et de l'ARN ribosomique, auquel s'associe probablement l'ARN messager dont la présence permet l'agrégation des particules élémentaires (ISHIHAMA et COLL, 1962). Les ribosomes seraient ensuite libérés dans le suc nucléaire et dans le cytoplasme (GEORGIEV et COLL, 1961). L'existence d'une synthèse protéique a été démontrée dans le nucléole (BIRNSTIEL et COLL, 1961) et dans le suc nucléaire (GEORGIEV et SAMARINA, 1961).

Les conclusions que nous pouvons tirer de l'étude des ARN nucléaires du rein et de leur métabolisme in vivo sont donc fructueuses puisqu'elles nous indiquent le rôle du noyau dans la synthèse des ARN. Nous avons complété ces recherches par des expériences réalisées in vitro sur des noyaux isolés. Celles-ci seront rapportées dans le chapitre consacré à l'étude in vitro de la corrélation ARN-NAD. Nous avons préféré présenter d'abord les résultats obtenus in vivo quant à l'effet de la nicotinamide sur l'ARN nucléaire par l'utilisation des techniques de fractionnement que nous avons décrites.

B. LA CORRELATION ARN - NAD DANS LE NOYAU CELLULAIRE

Cette étude a surtout eu pour but de localiser le site nucléaire et le type d'ARN qui sont en relation avec la synthèse du NAD. Nous décrirons successivement les étapes de cette recherche, puis nous évoquerons le problème des rapports nucléo-cytoplasmiques.

1. LOCALISATION INTRANUCLEAIRE

Les méthodes de fractionnements nucléaires risquent toujours de faire apparaître des artéfacts. Pour cette raison, nous avons d'abord songé à utiliser une méthode biologique pour visualiser les différents ARN nucléaires suivant leur activité métabolique. En faisant varier le temps pendant lequel on laisse le $^{32}PO_4$ pénétrer dans l'ARN, on doit pouvoir marquer plus ou moins électivement telle ou telle espèce d'ARN nucléaire. Comme nous l'avons vu, l'ARN labile (messager) devient le premier radioactif et l'ARN ribosomique n'incorpore l'isotope que plus lentement. Lorsque le phosphore radioactif est administré 13 heures avant le sacrifice (tableau 14), l'activité spécifique de l'ARN du noyau est inférieure à celle de l'ARN cytoplasmique. Si on réduit le délai entre l'administration du $^{32}PO_4H_3$ et la sacrifice à 7 heures où à 90 minutes, c'est le phénomène inverse qui se produit. Le tableau 14 montre que la réduction de l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN, que provoque la nicotinamide, est 2,5 fois plus importante 90 minutes après l'injection de l'isotope qu'après des temps plus longs (l'inhibi-

TABLEAU 14

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR LE METABOLISME DE L'ARN NUCLEAIRE

Etude cinétique après l'injection de $^{32}PO_4$

Délai entre l'injection du $^{32}PO_4$ et le sacrifice			13 heures			7 heures			90 minutes		
Activ. spécif. moy. PO_4 minéral. cpm / uAt P			24.000			39.350			79.850		
		Exp. N°	Tem.	Nic.	diff. en p. cent	Tem.	Nic.	diff. en p. cent	Tem.	Nic.	diff. en p. cent
Activ. spécif. ARN cpm / µM nucleot.	Tissu entier	1	5000	4840	—3	3820	3820	0	1940	1550	—20
		2	5020	4970	—1	3620	3500	—3	2900	2550	—12
	Noyaux	1	2580	2000	—22	11450	7600	—34	5580	2820	—50
		2	3130	2600	—17	10600	8880	—16	7050	4040	—43

tion dans l'ARN du tissu entier est vraisemblablement un artéfact dû à la grande quantité d'isotope incorporé dans le noyau par rapport au cytoplasme et à la baisse considérable de l'incorporation dans l'ARN nucléaire).

On pourrait expliquer cette plus grande inhibition de la synthèse d'ARN à de courts délais après l'injection du $^{32}PO_4$ en admettant que l'ARN labile est particulièrement sensible à l'effet de la nicotinamide. Cependant il n'est pas possible de conserver cette interprétation de nos expériences. En effet, l'action de la nicotinamide ne commence pas immédiatement après l'injection de la vitamine. Ainsi, si on injecte le $^{32}PO_4$ en même temps que la nicotinamide, où même 7 heures après, le métabolisme de l'ARN n'est pas encore inhibé et une certaine partie de la radioactivité va s'incorporer alors que la synthèse nucléique est encore normale. Ceci ne se produit pas si l'isotope est donné seulement 90 minutes avant le sacrifice, soit 10 heures 30 minutes après le début de l'expérience; dans ce cas l'inhibition est déjà réalisée et la quantité de phosphore radioactif qui pénètre est faible. Cette interprétation semble d'autant plus exacte que la synthèse de NAD n'est maximale que 10 à 13 heures après l'injection de l'amide nicotonique (fig. 1). L'utilisation d'une méthode biologique s'avère donc impossible. Nous avons préférer revenir aux autres méthodes de fractionnement.

Nous avons évidemment utilisé les techniques présentées dans les pages précédentes: soit fractionnement des ARN isolés, soit fractionnement du noyau cellulaire.

a) FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ARN NUCLEAIRE

Afin de distinguer parmi les ARN que l'on sépare sur la colonne d'albumine méthylée, ceux dont la synthèse est réduite par l'administration de la nicotinamide, nous avons choisi les conditions expérimentales telles que tous les ARN du noyau soient marqués par le $^{32}PO_4H_3$. Ceci est réalisé si on injecte l'isotope (3 mc/kg) 2 h. 30 min. avant le sacrifice. Les figures 19 et 20 présentent deux expériences dans lesquelles nous avons chromatographié parallèlement les ARN nucléaires obtenus chez des animaux normaux et chez des animaux ayant reçu la nicotinamide (650 mg/kg) 13 heures avant le sacrifice. Les chromatogrammes représentés dans la figure 19 ont été réalisés avec une vitesse d'élution de 45 ml/heure. Dans la seconde expérience (figure 20), cette vitesse a été ramenée à 30 ml/heure. Nous avons déjà indiqué que l'emploi d'une élution lente permettait d'obtenir une meilleure séparation des divers ARN nucléaires. Mais le tracé général du chromatogramme n'est pas essentiellement modifié.

L'injection de la nicotinamide ne provoque pas de changement dans le tracé de l'absorption dans l'UV. Rappelons à cet égard que la quantité d'ARN nucléaire du rein est la même chez les animaux normaux et chez ceux traités par la nicotinamide (voir tableau 3). Si on considère l'activité incorporée dans chaque fraction, il apparaît que l'ARN ribosomique 20 S a une activité spécifique très inférieure chez les rats traités par l'amide nicotinique. Au contraire, l'ARN labile 30 S n'est pas moins radio-actif chez les animaux traités que chez les témoins. De plus, il apparait après administration de la nicotinamide, une fraction supplémentaire (fraction IV) qui se situe dans le tracé d'élution après l'ARN 30 S. Cette fraction n'existe pas ou en quantité minime chez les animaux normaux.

Il semble donc que l'inhibition consécutive à la stimulation de la synthèse du NAD se fasse surtout ressentir au niveau de l'ARN ribosomique 20 S du noyau.

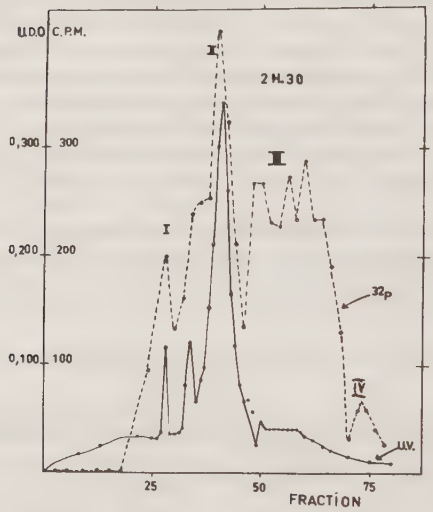
FIGURE 19

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR L'ARN NUCLEAIRE DU REIN

Chromatographie de l'ARN nucléaire

2 h. 30 minutes après l'injection de $^{32}PO_4$

Témoins



+ Nicotinamide

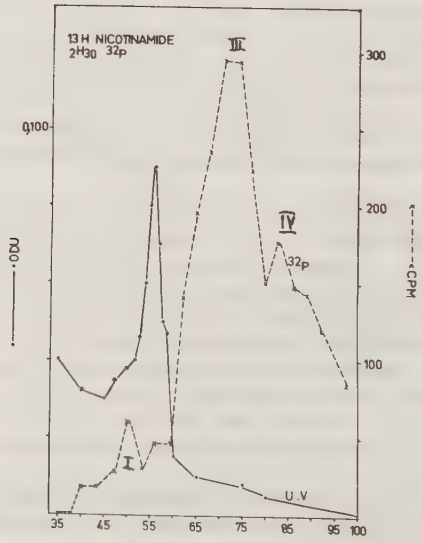


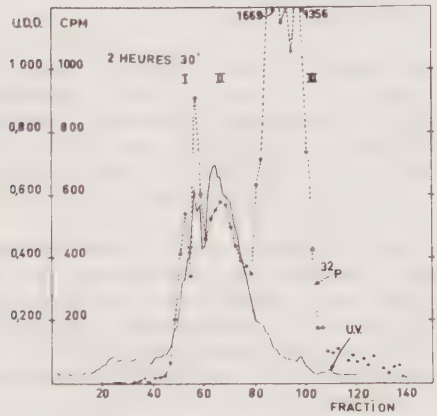
FIGURE 20

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR L'ARN NUCLEAIRE DU REIN

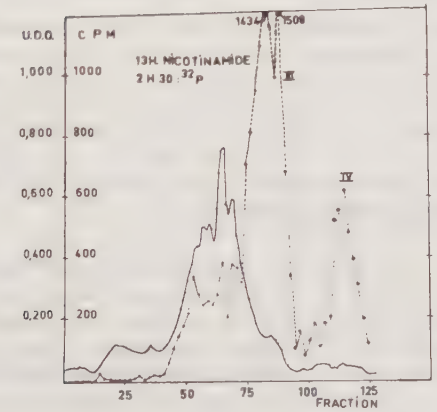
Chromatographie avec élution 30 ml/h.

2 h. 30 minutes après l'injection du $^{32}PO_4$

Témoins



+ Nicotinamide



Cependant, comme il est difficile de calculer avec exactitude la quantité d'ARN labile 30 S à partir des valeurs de l'absorption dans l'UV, puisqu'il n'est pratiquement localisé sur le chromatogramme que par sa forte radioactivité, l'évaluation de l'activité spécifique de cet ARN est imprécise. Les variations de celles-ci ne paraissent pas significatives; de toute manière on ne constate pas de réduction importante de l'activité incorporée dans cet ARN. La présence de la fraction radioactive IV indique que l'action de la nicotinamide ne peut pas se résumer par une simple inhibition de la synthèse d'ARN. Les expériences que nous décrirons dans les prochaines pages ont confirmé d'ailleurs cette façon de voir.

b) FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE

Ce type de fractionnement que nous avons déjà décrit dans l'étude du métabolisme nucléaire permet, lui, d'obtenir la valeur exacte de l'activité spécifique des ARN de chaque compartiment nucléaire. Cependant, les fractions isolées représentent certainement encore un mélange de plusieurs types d'acides nucléiques. Les résultats de cette méthode ne peuvent donc s'éclairer que par la comparaison avec la technique chromatographique.

Quatre animaux ont reçu 13 heures avant le sacrifice une dose de 650 mg/kg de nicotinamide. Quatre autres ont servi de témoins. Le $^{32}PO_4$ (3 mc/kg) a été administré à tous les rats 2 h 30 avant le sacrifice. Les noyaux sont fractionnés selon le schéma de la figure 7. Le tableau 13 rappelle les résultats de ce type de fractionnement. Les variations enregistrées entre les animaux traités par l'amide nicotinique et témoins sont présentées dans le tableau 15. Il apparaît

TABLEAU 15

EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR LE METABOLISME DES DIFFERENTES FRACTIONS D'ARN DU NOYAU CELLULAIRE RENAL

Activités spécifiques de l'ARN. Différences en p. cent.

Exp. N°	Surnageant	Ribosomes	ARN - ADN	Nucléol. I	Nucleol. II
I	+ 3	— 62	+ 6	— 18	+ 50
II	+ 22	— 25	—	— 25	+ 6
III	+ 1	— 30	+ 2	— 38,5	+ 22

Conditions expérimentales : Nicotinamide (650 mg kg) : 13 h.
$^{32}PO_4$ (3 mc/kg) : 2 h. 30 min.

nettement que dans deux fractions l'incorporation du ^{32}P dans l'ARN est nettement inhibée par la nicotinamide: les activités spécifiques de l'ARN isolé à partir des ribosomes nucléaires et de l'ARN nucléolaire I sont abaissées dans toutes les expériences. Au contraire, la fraction surnageante du suc nucléaire et la fraction nucléolaire II montrent un léger accroissement de la quantité d'isotope incorporé dans l'ARN. Enfin, la fraction d'ARN extraite avec l'ADN ne semble pas varier significativement.

Ces résultats confirment donc ceux obtenus par la chromatographie. Ils montrent l'existence d'une inhibition de la synthèse de l'ARN des ribonucléoprotéines

dans le noyau. Cette inhibition est nette, non seulement lorsqu'on examine l'ARN des particules ribosomiques mais aussi au niveau de l'ARN nucléolaire I. Il est important de signaler à nouveau que celui-ci a une composition en nucléotides identique à celle de l'ARN ribosomique alors que l'ARN nucléolaire II présente une composition voisine de celle de l'ADN (SIBATANI et COLL, 1962; GEORGIEV et COLL, 1962). GEORGIEV et CHENTSOV (1962) ont montré récemment par la microscopie électronique, que le nucléole contenait des formations identiques aux ribosomes du suc nucléaire mais celles-ci sont fixées sur un système de fibrilles qui empêchent leur extraction par un tampon neutre. Ces résultats suggèrent que ces formations nucléolaires pourraient être les ribosomes nouvellement synthétisés ou les précurseurs des ribosomes nucléaires et cytoplasmiques. Nous avons déjà indiqué que le comportement chromatographique de l'ARN nucléolaire I est identique à celui de l'ARN ribosomique 20 S. Dans cette perspective l'action identique de la nicotinamide sur l'ARN nucléolaire I et sur l'ARN des particules ribonucléoprotéiques du suc nucléaire peut s'expliquer. En réduisant à 10 h 30 le délai qui sépare l'administration de l'amide nicotinique et le sacrifice, nous avons pû constater une inhibition importante (de 40%) de l'activité spécifique de l'ARN nucléolaire alors que l'ARN des ribosomes est légèrement plus radioactif chez les animaux traités que chez les témoins. Il semblerait donc que l'action de la régulation ARN - NAD débute au niveau du système enzymatique responsable de la synthèse de l'ARN nucléolaire. Il est tentant de considérer l'ARN nucléolaire I comme le précurseur de l'ARN ribosomique : lorsque la synthèse du précurseur est inhibée, la formation du produit est rapidement réduite. Cependant, comme l'indique le tableau 13, l'activité spécifique de l'ARN des ribomoses 1 heure après l'injection de $^{32}PO_4$ est supérieure à celle de l'ARN nucléolaire; 2 heures 30 après cette injection, un rapport inverse est établi. Ceci contredirait l'hypothèse d'un rôle précurseur du second pour le premier. Néanmoins les ribosomes nucléaires ne contiennent pas uniquement de l'ARN ribosomique; ils sont certainement contaminés par la présence d'ARN transfert et d'ARN messager. En effet, si on isole l'ARN proprement ribosomique par chromatographie son activité spécifique est très inférieure à celle de l'ARN total des ribosomes séparés par fractionnement subnucléaire. Il est donc difficile dans ces conditions de conclure quant au rapport entre l'ARN nucléolaire I et l'ARN des ribosomes nucléaires.

La stimulation nette de l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans les polynucléotides de la fraction nucléolaire II que l'on observe 13 heures après injection de la nicotinamide nous montre encore une fois que le mécanisme de la régulation ARN - NAD est complexe. Ceci est encore plus net si l'on réduit le délai de l'action de la nicotinamide à 10 heures 30: la stimulation se manifeste alors dans la fraction ribosomique. Enfin, si le délai est réduit à 7 heures, tous les fractions présentent chez les animaux traités une activité spécifique supérieure à celle des témoins. L'explication de ce phénomène nous a été fournie par l'étude in vitro de la relation ARN - NAD. Cependant, avant d'abandonner ces expériences in vivo, il nous reste encore un problème à évoquer.

2. RELATIONS NUCLEO-CYTOPLASMIQUES

Tous les résultats que nous avons présentés jusqu'à ce point montrent que la perturbation dans le métabolisme de l'ARN provoquée par une stimulation de la biosynthèse des coenzymes à pyridine prend son départ dans le noyau cellulaire. En effet, ce n'est que 24 heures après le début du traitement par la nicotinamide

que le métabolisme de l'ARN cellulaire total est inhibé. La question se pose donc de savoir si dans le cytoplasme c'est également l'ARN ribosomique qui est atteint par l'effet de la nicotinamide.

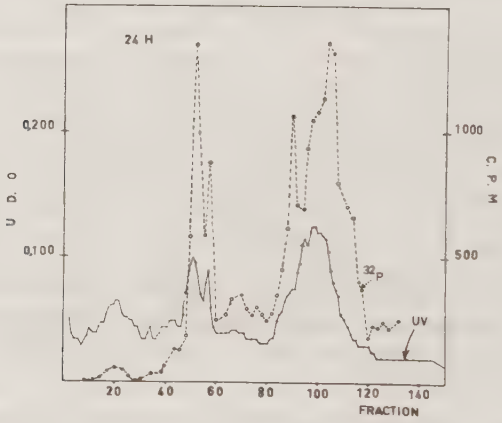
Nous avons chromatographié sur albumine méthylée l'ARN total de la cellule rénale, 24 heures après l'injection du ^{32}P; d'une part, chez des animaux normaux, d'autre part, chez des rats ayant reçu la nicotinamide (650 mg/kg 13 heures). La figure 21 présente les chromatogrammes obtenus. Nous avons déjà analysé le chromatogramme témoin (voir page 47). Après administration de

FIGURE 21

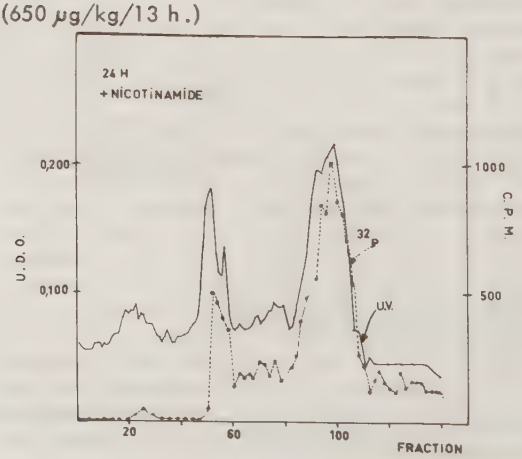
EFFET DE LA NICOTINAMIDE SUR LE RENOUVELLEMENT DE L'ARN

Chromatographie de l'ARN rénal. 24 heures après l'injection de $^{32}PO_4$

Témoins



+ Nicotinamide (650 µg/kg/13 h.)



nicotinamide, le tracé de l'absorption dans l'UV n'est pas modifié mais la radioactivité incorporée dans les deux types d'ARN est, elle, considérablement réduite. Cependant l'activité spécifique de l'ARN 20 S est deux fois plus faible que celle de l'ARN 30 S, alors que chez les témoins ces deux valeurs sont égales. L'action inhibitrice de la nicotinamide sur l'incorporation du phosphore radioactif dans l'ARN est donc surtout sensible dans l'ARN ribosomique 20 S. Cependant, une inhibition est nette aussi dans le pic d'ARN 30 S. Elle peut être attribuée à l'ARN ribosomique 30 S et on peut admettre que l'ARN labile qui se trouve dans cette fraction n'est que peu modifié.

L'existence dans le cytoplasme en grande quantité d'un type d'ARN qui est relativement moins abondant dans le noyau cellulaire pose évidemment un problème important. S'agit-il d'une synthèse extranucléaire d'ARN ou plutôt de l'accumulation d'un acide nucléique produit en faible quantité dans le noyau? Une troisième possibilité doit être évoquée, celle d'un assemblage dans le cytoplasme de deux chaînes d'ARN de plus faible poids moléculaire: à cet égard, la présence dans ce pic à la fois d'ARN labile et d'ARN ribosomique peut être significative.

II. IN VITRO

La compréhension exacte du mécanisme complexe de la régulation ARN - NAD ne peut être apportée par les seules études in vivo. Nos connaissances sur les relations nucléo-cytoplasmiques sont encore trop réduites pour que des expériences réalisées sur l'ensemble de la cellule rénale puissent prouver avec certitude la localisation strictement nucléaire de l'effet de la nicotinamide. Pour montrer que les phénomènes observés dans le cytoplasme en rapport avec la régution ARN - NAD, sont secondaires par rapport à ceux du noyau, il faut opérer sur des noyaux isolés. Un seul des enzymes impliqués dans la synthèse des nucléotides à pyridine est strictement intranucléaire. L'étude des noyaux isolés permettrait donc de préciser l'étape de la synthèse du NAD qui est en compétition avec la formation d'ARN. Enfin, l'étude in vitro, en permettant de faire varier les conditions expérimentales, peut, seule, dégager le mécanisme biologique en cause.

Comme pour nos études in vivo, nous avons dû commencer par étudier le noyau isolé de la cellule rénale, les conditions d'incorporation de précurseurs radioactifs de l'ARN et la mise au point des méthodes nécessaires à l'étude in vitro de la régulation ARN - NAD.

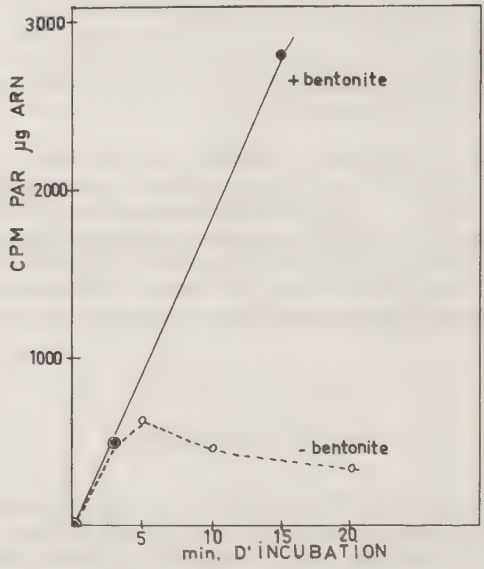
A. ÉTUDE DE L'INCORPORATION DES PRÉCURSEURS MARQUES DANS L'ARN

1. ETUDE GLOBALE

Nous avons choisi comme précurseur radioactif l'adénine-8-^{14}C qui s'incorpore facilement dans les noyaux cellulaires incubés in vitro (BREITMANN et WEBSTER, 1959). Le milieu d'incubation qui a été décrit par LOGAN (1957) pour les noyaux du foie s'est révélé être un milieu convenant également pour les noyaux des cellules rénales.

FIGURE 22

INCORPORATION D'ADENINE-^{14}C DANS L'ARN NUCLEAIRE IN VITRO



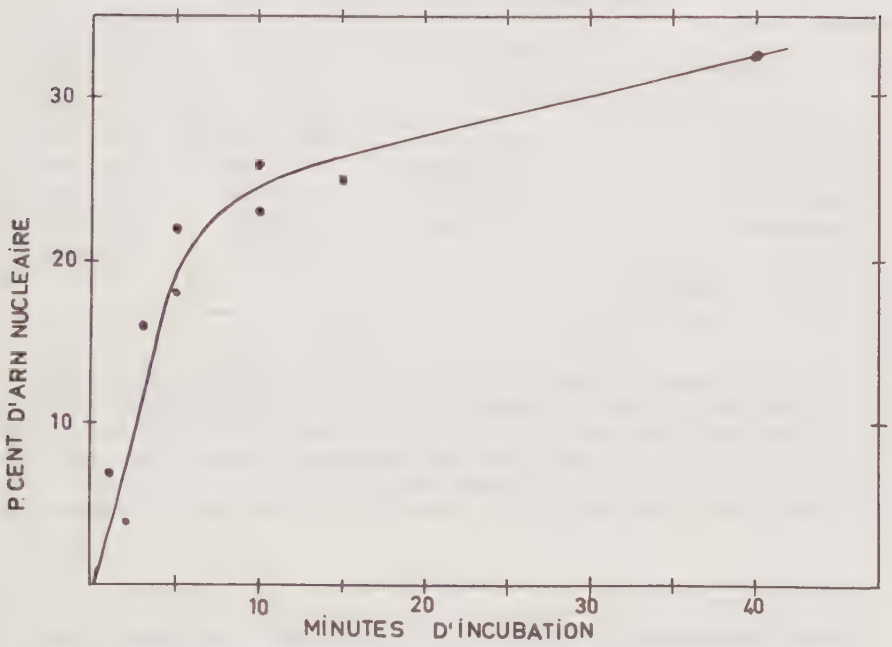
La figure 22 montre l'incorporation de l'adénine-8-^{14}C dans l'ARN nucléaire en fonction du temps d'incubation. Il apparaît immédiatement que cette incorporation n'est pas proportionnelle au temps. Forte dans les premières minutes elle se stabilise dès la 5e minute. En présence de bentonite (concentration finale 0,3%) la quantité d'adénine ^{14}C incorporée est bien supérieure et la proportionnalité en fonction du temps est rétablie. Ce phénomène montre que le noyau rénal contient vraisemblablement des nucléases actives qui détruisent le polynucléotide formé. La bentonite, qui est un inhibiteur connu de la ribonucléase (BROWNHILL, 1959) s'oppose également à l'action de la desoxyribonucléase. On peut admettre que d'autres enzymes sont également inhibés puisque l'absorption des sites enzymatiques sur la bentonite n'est pas un phénomène spécifique à un seul enzyme. Quoiqu'il en soit, l'incorporation de l'adénine ^{14}C dans l'ARN est très augmentée en présence de bentonite, mais cette stimulation n'est pas la même pour toutes les fractions d'ARN nucléaire. C'est pourquoi, nous avons fractionné les noyaux après incubation in vitro et mesuré l'activité spécifique de l'ARN des divers compartiments nucléaires, ainsi que d'un ARN qui quitte le noyau et qui est donc susceptible d'être protégé par la bentonite contre les nucléases.

2. FRACTIONNEMENT NUCLEAIRE

Nous avons utilisé comme précédemment la technique dérivée de celle décrite par SIBATANI et COLL. (1962). Les noyaux, après incubation dans le milieu de Logan, sont isolés à nouveau par centrifugation (1.000 x g x 10') puis le fractionnement est réalisé selon le schéma de la figure 7. Pour être certain de ne

FIGURE 23

MIGRATION DE L'ARN So EN FONCTION DU TEMPS



perdre aucune fraction, nous avons conservé le milieu d'incubation et recherché s'il contenait de l'ARN. Nous avons constaté qu'une fraction appréciable de l'ARN nucléaire quittait le noyau durant l'incubation et se retrouvait dans le milieu de Logan après sédimentation des noyaux. La figure 23 représente l'importance relative de cette fraction, que nous avons appelée So, par rapport à l'ensemble des ARN du noyau. La sortie de l'ARN So est fonction du temps d'incubation, mais la pente de la courbe est plus accentuée durant les 5 premières minutes. Nous avons vérifié qu'il ne pouvait s'agir d'une lyse des noyaux: l'observation microscopique montre des noyaux intacts et surtout on ne retrouve pas de quantité appéciable d'ADN libéré dans le milieu d'incubation.

La répartition de l'ARN dans les fractions subnucléaires est présentée dans le tableau 16. Les valeurs observées pour le suc nucléaire et le nucléole sont très voisines de celles obtenues avec les noyaux fraîchement préparés. La fraction ARN - ADN est, elle, beaucoup plus faible: il semblerait donc que l'ARN So est issu des formations chromosomiques et qu'au cours de l'incubation la libération d'ARN-ADN est plus rapide qu'elle n'est in vivo. La présence de bentonite dans le milieu d'incubation modifie la migration de l'ARN So. Le tableau 16 montre que des noyaux incubés en présence de bentonite ne perdent que 5% de l'ARN en 15'. La comparaison entre la répartition de l'ARN dans les fractions subnucléaires des noyaux incubés avec et sans bentonite indique que l'ARN So provient à la fois de la fraction chromosomique et de la fraction nucléolaire II et montre que l'ARN-ADN est stocké dans le nucléole avant de quitter le noyau. Rappelons que la fraction nucléolaire II contient l'ARN messager.

TABLEAU 16

REPARTITION DE L'ARN DANS LES FRACTIONS SUBNUCLEAIRES

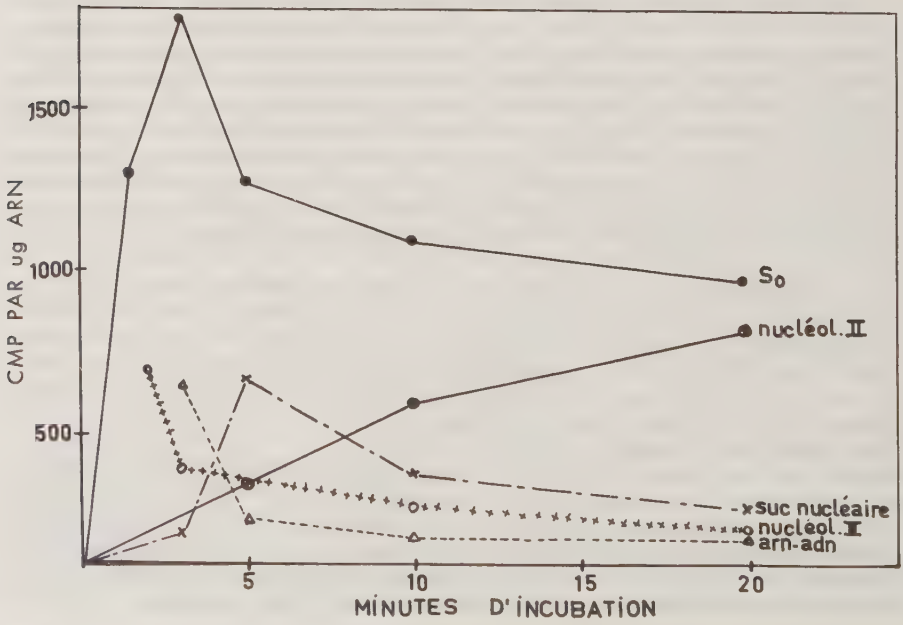
Pourcentage de l'ARN nucléaire total

Fraction	Noyaux non incubes.	Incubation 15 min.	Incubation + bentonite
Suc nucléaire	46 p. cent	52 p. cent	49 p. cent
ARN - ADN	36 p. cent	10 p. cent	17 p. cent
Nucléolaire I	9 p. cent	9 p. cent	9 p. cent
Nucléolaire II	9 p. cent	9 p. cent	20 p. cent
ARN SO	—	20 p. cent	5 p. cent
Nombre d'expériences	5	9	3

L'ARN So apparaît donc comme un polynucléotide bien individualisé du point de vue de sa localisation intranucléaire. Ses propriétés métaboliques le font différer également des autres ARN nucléaires. La figure 24 montre l'incorporation de l'adénine ^{14}C dans les compartiments subnucléaires en fonction du temps d'incubation. L'ARN So est le plus rapidement marqué et sa radioactivité se maintient au-dessus de celle des autres ARN du noyau. L'ARN nucléolaire II se marque plus

FIGURE 24

INCORPORATION D'ADENINE-^{14}C DANS L'ARN DES FRACTIONS SUBNUCLEAIRES IN VITRO



lentement mais son activité spécifique devient rapidement plus élevée que celle des autres fractions intranucléaires. Ceci rejoint les observations in vivo dans lesquelles l'ARN nucléolaire II est toujours la fraction la plus radioactive. Il est à noter que l'ARN - ADN et l'ARN nucléolaire I sont marqués très rapidement mais leur activité spécifique chute très vite. L'ARN du suc nucléaire présente une courbe d'activité voisine de celle de l'ensemble des ARN nucléaires. Il faut se rappeler que dans le suc nucléaire on trouve de l'ARN ribosomique, de l'ARN transfert et de l'ARN messager. Il n'est pas possible de tirer de ces études cinétiques des conclusions absolues quant au rapport métabolique des divers types d'ARN. Néanmoins, sachant que la répartition des nucléotides dans l'ARN nucléolaire I est identique à celle de l'ARN ribosomique, on peut admettre à partir des données de la figure 24 que cet ARN nucléolaire est le précurseur de l'ARN des ribosomes. Peut-on conclure de la même façon au rôle précurseur de l'ARN -ADN ou de l'ARN So pour l'ARN nucléolaire II? Une étude plus détaillée de la nature de l'ARN So est encore nécessaire.

La présence de bentonite dans le milieu d'incubation ne stimule pas uniformément l'incorporation de l'adénine-^{14}C dans les différentes fractions nucléaires. L'augmentation la plus importante se manifeste dans la fraction ARN So dont la radioactivité spécifique est 20 fois plus élevée en présence de bentonite. Ceci s'explique vraisemblablement par le fait que la bentonite protège l'ARN qui a quitté le noyau contre l'action des nucléases.

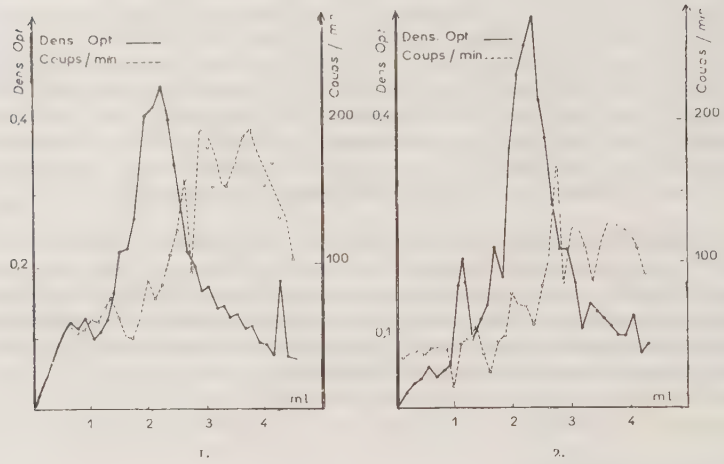
3. ETUDE DE L'ARN So

La fraction de l'ARN So qui quitte le noyau au cours de l'incubation dont l'origine semble être chromosomique et nucléaire, et qui incorpore rapidement l'adénine radioactive, répond évidemment à la définition de l'ARN messager. SCHOLTISSEK (1962) a observé avec les noyaux hépatiques isolés chez des animaux ayant reçu du $^{32}PO_4$ et incubés dans un milieu analogue au nôtre, la migration dans le milieu d'incubation d'un ARN très labile qu'il assimile à l'ARN messager. L'intérêt de cette fraction So est donc évident. Pour tenter d'identifier cet ARN migrateur, nous avons recherché d'abord les caractéristiques physico-chimiques puis certaines caractéristiques de type messager.

L'étude des propriétés macromoléculaires d'un ARN exige la certitude d'avoir un échantillon qui ne soit pas dégradé. En effet, comme nous l'avons déjà signalé, les noyaux des cellules rénales possèdent des nucléases actives qui hydrolysent l'ARN formé au cours de l'incubation avec l'adénine-^{14}C. Dans tous les tissus où l'on recherche l'ARN messager, on a toujours constaté que celui-ci était très sensible à l'action ribonucléasique. Seul le blocage rapide de la ribonucléase permet d'obtenir une préparation non dégradée. Le traitement par le dodécyl sulfate de sodium qui rompt les liaisons entre les acides nucléiques et les protéines est à peine suffisant pour inhiber l'action ribonucléasique dès que l'intégrité cellulaire est atteinte. L'incubation des noyaux isolés in vitro désorganise suffisamment la structure du noyau pour provoquer la dégradation de l'ARN. En effet, nous avons analysé par ultracentrifugation dans un gradient de saccharose (GROS et COLL, 1961) les ARN formés durant l'incubation in vitro en présence d'adénine-^{14}C. La figure 25 montre que les fractions radioactives sont très hétérogènes puisque les constantes de sédimentation sont échelonnées de 27 S à 8 S. La fraction la plus importante correspondant à 14 S. Il paraît vraisemblable d'admettre que les fractions légères ne sont que les produits de dépolymération des fractions

FIGURE 25

SEDIMENTATION DE L'ARN NUCLEAIRE APRES INCUBATION IN VITRO AVEC L'ADENINE-8-^{14}C
(sans bentonite)



1. - Sédimentation du RNA nucléaire rénal. Animaux normaux.
2. - Sédimentation du RNA nucléaire rénal. Animaux ayant reçu la nicotinamide.

les plus lourdes. Rappellons, en effet, que la sédimentation des ARN nucléaires isolés in vivo 1 heure après l'injection du ^{32}P montre des constantes de sédimentation comprises entre 20 S et 30 S. Dans ce cas, le traitement par le dodécyl sulfate de sodium a permis d'éviter l'action de la ribonucléase.

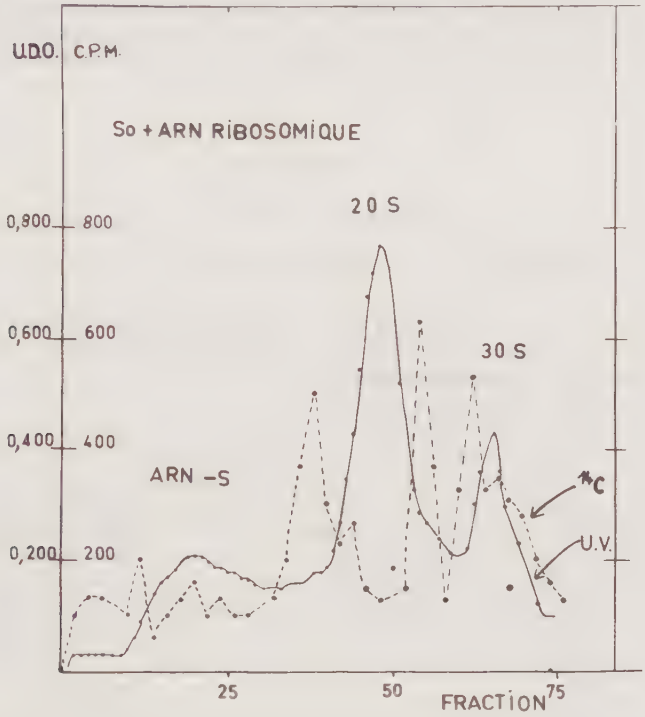
Dans l'étude de la fraction So il était donc important d'inhiber, pendant l'incubation les activités nucléasiques. La bentonite (concentration finale 0,3%), quoiqu'elle modifie la migration de l'ARN So nous a semblé être indispensable pour la réalisation des expériences présentées ci-dessous.

Une préparation de noyaux rénaux a été incubée pendant 5 minutes en présence de 6 μc d'adénine-^{14}C dans le milieu de Logan additionné de bentonite. Les noyaux sont séparés et l'ARN présent dans le liquide d'incubation est préparé par la méthode au phénol de KIRBY (1956). Notons que dans le cas de l'ARN So il ne reste pas d'ARN dans la phase phénolique, mais celle-ci contient des protéines. Après précipitation de la phase aqueuse par l'alcool, l'ARN est repris dans un tampon Tris 0,02 M (pH 7,0)- NaCl 0,1 M et mélangé avec de l'ARN préparé à partir de ribosomes hépatiques purifiés au desoxycholate de sodium. La chromatographie sur albumine méthylée est faite selon la technique déjà décrite. La figure 26 montre le résultat obtenu. Le profil de l'absorption dans l'UV est celui que nous avons déjà décrit pour l'ARN des ribosomes: ARN transfert 4 S, ARN ribosomiques 20 S et 30 S. La radioactivité indique la place de l'ARN So. On constate la présence de trois pics: l'un correspondant à l'ARN 30 S (fraction

FIGURE 26

ETUDE DE L'ARN So

Chromatographie en présence d'ARN des ribosomes du foie



radio-active III), le second se situe entre les ARN 20 S et 30 S, le troisième avant l'ARN 20 S. Le tracé de la radioactivité correspond à celui qui a été décrit pour l'ARN messager dans les cellules bactériennes par OTAKA et COLL, (1962) et par MONIER et COLL, (1962). Les premiers ont montré que la fraction radioactive la plus lourde (fraction III) correspondait au véritable ARN messager (ISHIHAMA et COLL, 1962), les deux fractions plus légères étant probablement des produits de dépolymérisation.

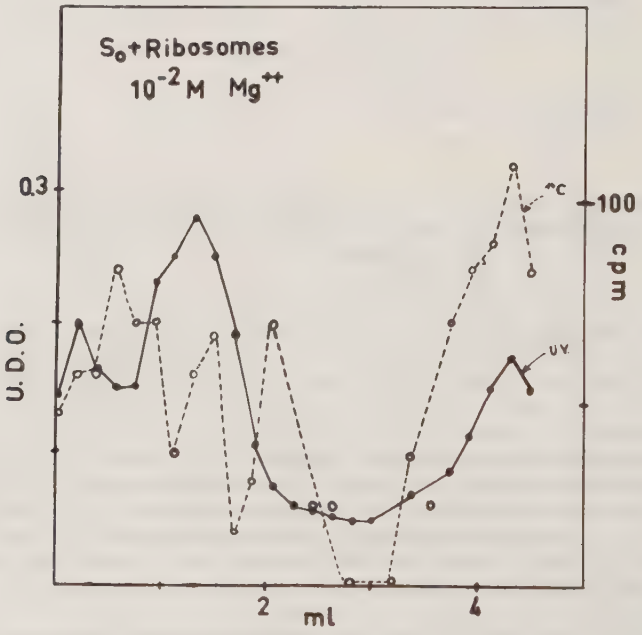
Pour tenter de dégager une caractéristique de type "messager" nous avons étudié la fixation de l'ARN So sur les ribosomes in vitro. Il a été démontré en effet que l'ARN messager formait un complexe avec l'ARN ribosomique (GROS et COLL, 1961) et servait ainsi de matrice pour la synthèse des protéines spécifiques. Il s'agit donc de qualité propre à l'ARN messager. L'ARN So est préparé comme ci-dessus, mélangé avec des ribosomes de foie purifié au desoxycholate et dyalisé une nuit contre une solution de chlorure de magnésium 10^{-2}M. Le mélange est alors déposé à la surface d'une solution de saccharose présentant un gradient de concentration de 20 à 5% et centrifugé pendant 3 heures à 25.000 tours/min. dans le rotor SPINCO SW 25 à 2°C. Le fond du tube est alors percé et le liquide récupéré goutte à goutte. Des aliquotes de chaque fraction servent à la détermi-

nation de l'absorption à 260 mμ et de la radioactivité. La figure 27 montre le diagramme obtenu. Le tracé de l'absorption dans l'UV révèle l'existence des ribosomes qui, à cette concentration en ions Mg^{++}, existent sous forme de particules 70 S et 100 S. L'ARN So est repéré par la radioactivité de l'adénine-^{14}C incorporée. Une partie appréciable de cet ARN sédimente avec les ribomoses tandis que le reste se retrouve à la surface du saccharose. La chromatographie sur colonne d'albumine méthylée nous a montré que l'ARN So avait une constante de sédimentation au maximum de 30 S. La présence de l'ARN dans la zône des ribosomes 70 S ne peut donc s'expliquer que comme une fixation de l'ARN messager sur l'ARN du ribosome.

FIGURE 27

ETUDE DE L'ARN So

Fixation sur des ribosomes au cours de la sédimentation en gradient de saccharose



RISEBROUGH, TISSIERES et WATSON (1962) ont indiqué récemment que lorsqu'on évite les dégradations de l'ARN messager fixé sur les ribosomes, la constante de sédimentation de l'ensemble est plus élevée. La radioactivité sur le tracé de l'ultracentrifugation est alors plus lourde que les ribosomes 100 S. Nous n'avons observé que des complexes 70 S et il faut penser que notre préparation d'ARN messager est partiellement dégradé. Cette dégradation explique également les résultats de la chromatographie sur albumine méthylée: seule la fraction radioactive 30 S correspond à l'ARN messager intact, les deux autres fractions, plus légères, étant des produits de dépolymérisation.

Rappellons que les chromatographies que nous avons faites avec l'ARN nucléaire du rein marqué in vivo, nous ont montré l'existence d'une fraction très labile qui se superpose exactement sur le chromatogramme à la fraction III fournie par l'ARN So. Ainsi, la fraction So qui quitte le noyau au cours de l'incubation in vitro doit correspondre à l'ARN labile que nous avons retrouvé dans les noyaux après marquage in vivo par le phosphore radioactif. Les faits expérimentaux que nous venons de décrire montrent qu'il s'agit bien là de l'ARN messager de la cellule animale.

° ° °

Quelle est la signification de la migration de l'ARN So. Est-elle le reflet d'un phénomène biologique existant dans la cellule intacte? Il serait satisfaisant d'admettre en effet, comme l'a fait SCHOLTISSEK pour la cellule hépatique, que cet ARN transportant une partie du message génétique, passe dans le cytoplasme et provoque la synthèse de protéines spécifiques. Cependant, aussi séduisante que soit cette théorie, aucune preuve ne peut être fournie par les faits que nous avons observés in vitro. Il est certain que l'isolement des noyaux et leur incubation à 37°C dans une solution de saccharose provoque des altérations de la structure du noyau et de sa membrane. Nous avons d'ailleurs observé que l'incubation in vitro des noyaux avant le fractionnement favorisait nettement l'extraction ultérieure du suc nucléaire par un tampon neutre. Ceci indique une modification certaine des rapports entre les particules nucléoprotéiques et l'appareil nucléolochromosomique et souligne les différences qui existent entre des expériences réalisées in vivo et in vitro.

Il est important de noter que l'effet de la bentonite sur la migration de l'ARN So. Nous avons signalé que la présence de cet inhibiteur de la ribonucléase dans le milieu d'incubation réduit 5 fois la quantité d'ARN qui quitte le noyau et que les fractions nucléolaires II et chromosomiques (ARN-ADN) sont proprotionnellement augmentées. Dans ces conditions on aurait pû penser que ce sont des fragments d'ARN produits par les nucléases qui franchissent la membrane nucléaire. Néanmoins, nous avons montré qu'en présence de bentonite, l'ARN qui migre est de haut poids moléculaire.

De nombreux travaux depuis CASPERSSON (1950) ont indiqué la migration d'ARN de haut poids moléculaire du noyau vers le cytoplasme (PRESCOTT, 1960). La migration de complexes nucléoprotéiques a été également décrite par MAZIA et PRESCOTT (1955); rappelons que nous avons trouvé des protéines avec l'ARN de la fraction So. La théorie de CASPERSON a pris un sens nouveau depuis la découverte de l'ARN messager et des rapports entre le génome et la synthèse protéique; il est évident que la démonstration du passage d'ARN messager depuis le noyau jusqu'au cytoplasme serait la confirmation de toutes les hypothèses avancées dans les dernières années dans le domaine de la régulation de la synthèse protéique.

B. CORRÉLATION DES SYNTHÈSES IN VITRO DE NAD ET D'ARN DANS LES NOYAUX ISOLÉS

Les étapes de la synthèse des coenzymes à pyridine ont été décrites par PREISS et HANDLER (1958). Trois réactions principales sont connues :

acide nicotinique + phosphoribosyl pyrophosphate $\longrightarrow$ NaMN + Pyrophosphate (1)

NaMN + ATP $\rightleftharpoons$ NaAD + Pyrophosphate (2)

NaAD + NH_3 + ATP $\longrightarrow$ NAD+AMP+Pyrophosphate (3)

Les enzymes responsables de (1) et (3) sont cytoplasmiques. La coenzyme I pyrophosphorylase (ou acide nicotonique mononucléotide adénylyl transférase) découverte par KORNBERG (1950) catalyse la réaction (2). HOGEBOOM et SCHNEIDER (1955) et PREISS et HANDLER (1958) ont montré que cet enzyme était strictement intranucléaire. Le NMN dérivé amidé du NaMN, peut également servir de substrat à cet enzyme; il se forme alors directement du NAD (ATKINSON et COLL, 1961). Bien que cette réaction ne se produise pas physiologiquement, son mécanisme est identique à (2). L'emploi du NMN permet de suivre facilement la réaction par le dosage enzymayique du NAD formé; dans nos essais nous avons choisi ce précurseur.

L'activité de la coenzyme I pyrophosphorylase a été étudiée avec le NMN dans les noyaux isolés de divers tissus: foie du rat adulte et de l'embryon, glande mammaire et épithélioma de la glande mammaire (BRANSTER et MORTON, 1956). Dans les tissus à prolifération rapide, cette activité enzymatique est bien plus réduite que dans les noyaux des cellules adultes saines. MORTON (1958) a montré que la faible teneur en NAD des tissus embryonnaires ou cancéreux peut être entièrement attribuée à ces variations de l'activité enzymatique. Nos recherches sur l'interrelation entre la synthèse des coenzymes à pyridine et la croissance nous ont montré que le noyau était le centre d'une régulation ARN - NAD. Il était donc pleinement justifié d'étudier dans le noyau isolé les relations entre la formation du NAD à partir du NMN et la synthèse de l'ARN.

TABLEAU 17

SYNTHESE DU NAD PAR LES NOYAUX ISOLES DE REIN IN VITRO

Micromoles de NAD formées par 2×10^8 noyaux pendant 15 min.

Pour un volume final de 2 ml µmoles NMN	µmoles ATP	Divers	µmoles NAD formées
0	10		0,024
6	5		0,645
6	10		0,850
6	20		0,860
6	10	PEP + PEP kin.	0,850
6	10	Dinitrophénol conc. 1 mM	0,650
6	10	DNP conc. 2 mM	traces
6	10	Bentonite	0,830
12	10		1,230

1. FORMATION DU NAD IN VITRO

Il fallait, avant tout, rechercher les conditions optimum de la synthèse in vitro dans les noyaux des cellules rénales. Le tableau 17 montre la quantité de coenzymes formés dans diverses conditions expérimentales. En utilisant 2×10^8 noyaux pendant 15 minutes, on observe une synthèse de 0,85 μM, soit seulement 15% du NMN présent dans le milieu a été transformé en NAD. La dose optimum d'ATP semble être 10 μM. En augmentant la quantité d'ATP ou en ajoutant au milieu un système générateur d'énergie, aucune stimulation de la formation de NAD n'apparaît. Par contre, avec 5 μM d'ATP, ou en utilisant un inhibiteur des oxydations phosphorylantes comme le 2, 4 dinitrophénol (1 mM), la synthèse du coenzyme est réduite de 25%. En l'absence d'ATP dans le milieu d'incubation ou en présence de dinitrophénol (2 mM), la synthèse est nulle. Remarquons encore que la présence de bentonite n'a aucun effet.

2. RELATION ARN-NAD

Pour étudier l'effet de la synthèse du NAD sur celle de l'ARN, nous avons mesuré l'incorporation de l'adénine-8-^{14}C. Comme nous l'avons signalé, il s'incorpore en 15 minutes 1,85 mμM d'adénine par mg d'ARN. En présence de NMN (tableau 18) cette valeur s'abaisse à 1,02 mμM d'adénine par mg d'ARN alors que 2,6 μM de NAD par mg d'ARN sont formés. L'inhibition de la synthèse d'ARN

TABLEAU 18

EFFET DE LA SYNTHESE DU NAD SUR L'INCORPORATION DE L'ADENINE-8^{14}C DANS L'ARN NUCLEAIRE RENAL IN VITRO *

Pour un volume final de 2 ml		$\mu\mu$moles adenine incorp. par mg d'ARN		μmoles NAD formés par mg d'ARN
μmoles NMN	μmoles ATP			
0	10	1850±250		0,06
6	10	1020±150	—45±15	2,60
0	0	1720		0,075
6	0	1800	0	0,080
0	20	2600		0,067
6	20	1660	—36	2,650

* Moyennes de 6 expériences.

est donc très nette puisqu'elle atteint 45%. Ceci n'est pas dû à une action directe du NMN puisqu'en l'absence d'ATP quand la formation du NAD est impossible il n'y a aucune inhibition dans l'incorporation de l'adénine radio-active dans l'ARN. Remarquons que l'absence d'ATP ne modifie que très faiblement la quantité d'adénine qui pénètre dans l'ARN.

Ces expériences montrent par conséquence qu'une stimulation de la réaction:

$$\text{NMN} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{NAD} + \text{pyrophosphate} \quad (4)$$

provoque une inhibition de l'incorporation de l'adénine-^{14}C dans l'ARN. Il est donc certain qu'une des étapes de l'utilisation de la base purique est altérée. Pour pénétrer dans l'ARN, l'adénine doit d'abord être transformée en un nucléoside polyphosphate. En effet, le principal enzyme nucléaire qui synthétise de l'ARN est la polymérase de WEISS (1960) qui catalyse la réaction de polymération des 4 nucléosides triphosphates en ARN en présence d'ADN et avec libération de pyrophosphate. BUSCH et COLL, (1962) ont montré que cet enzyme avait un rôle physiologique. Au contraire la polynucléotide phosphoraiyse de HILMOE et HEPPEL (1957) qu'ils ont décrit dans les noyaux du foie de cobaye, ne semble pas avoir une fonction dans la synthèse de l'ARN. La suite des réactions peut donc se résumer ainsi :

$$\text{adénine-}^{14}C + \text{PRPP} \longrightarrow \text{AMP-}^{14}C \qquad (5)$$

$$\text{AMP-}^{14}C \xrightarrow{\text{énergie : glycolyse ou oxydations}} \text{ATP-}^{14}C \qquad (6)$$

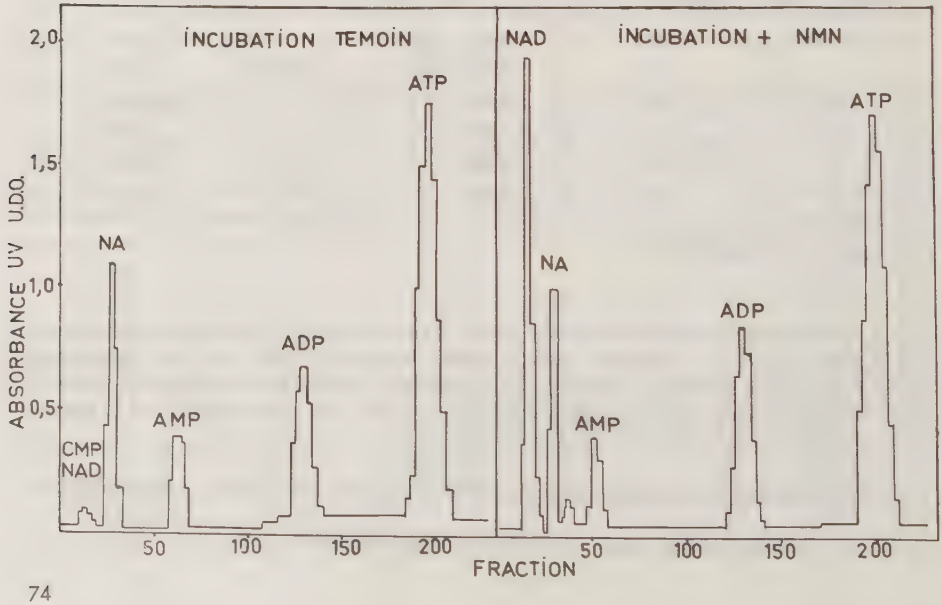
$$(\text{ATP-}^{14}C)_n + (\text{UTP})_n + (\text{CTP})_n + (\text{GTP})_n \xrightarrow{\text{ADN}} (\text{ARN})_n + (\text{pyrophosphate})_n \qquad (7)$$

Pour déterminer laquelle de ces réactions est inhibée par la synthèse du NAD, nous avons mesuré la radioactivité incorporée dans l'ATP nucléaire en présence et en absence de NMN.

3. EFFET DU NMN SUR L'ATP NUCLEAIRE

FIGURE 28

NUCLEOTIDES ACIDO SOLUBLES. NOYAUX IN VITRO



La fraction acido-soluble de chaque incubation est chromatographiée sur colonne de Dowex 2 X - HCOOH. La figure 28 montre un des chromatogrammes obtenus. On sépare facilement le NAD, l'acide nicotinique (qui souille toujours en petite quantité les préparations de nicotinamide), l'AMP, l'ADP et l'ATP. Les autres nucléotides libres sont en trop faible quantité pour être décelables. Les adénosines mono et diphosphate présents proviennent en partie de l'hydrolyse de l'ATP au cours de la manipulation. En effet, sur les 10 µM d'ATP introduits dans le milieu d'incubation, on ne retrouve que 5 µM tant en présence qu'en l'absence de NMN. 2,8 µM se retrouvent sous forme d'ADP et d'AMP. Il reste donc 2µM qui sont utilisées pour les synthèses diverses qui se font grâce à l'ATP: formation d'ARN, de NAD, synthèse protéique, etc...

Nous avons mesuré la radioactivité présente dans l'ATP et nous l'exprimons en coups/minute par µM de nucléotide (tableau 19). Il est impossible cependant

TABLEAU 19

INCORPORATION DE L'ADENINE-8-^{14}C DANS L'ATP ET LE NAD DURANT LA SYNTHESE IN VITRO DE NAD.

		ATP		NAD	
		µmoles	cpm/µmoles	µmoles	cpm/µmoles
EXP. 1 *	sans NMN	5,6	680	—	—
	avec NMN	5,2	3950	0,23	72000
EXP. 2 **	sans NMN	5,46	740	—	—
	avec NMN	4,0	3600	0,68	77000

* Par chromatographie sur colonne de Dowex 2-X.
** Par chromatographie sur papier.

de considérer que l'adénosine radio-active est répartie de façon homogène dans l'ATP isolé. Pour que l'incorporation des isotopes se fasse, il faut que le nucléotide soit fabriqué dans le noyau selon les réactions (5) et (6). Comme il est impossible de séparer l'ATP néoformé de l'ATP ajouté dans l'incubation, et comme le taux de ce composé est le même en présence et en l'absence de NMN, nous pouvons considérer l'activité spécifique globale comme une mesure de la quantité d'ATP fabriqué in vitro. Il apparaît nettement que cette quantité est 5 fois supérieure en présence de NMN. L'inhibition de la synthèse de l'ARN que nous avons mesurée est donc certainement plus faible que l'inhibition réelle puisque en présence de NMN le précurseur direct de l'ARN est marqué plus rapidement. De toutes manières, c'est uniquement la synthèse d'ARN à partir des nucléosides triphosphates qui est inhibée pendant la synthèse du NAD.

La stimulation de la formation d'ATP à partir de l'adénine-^{14}C durant la synthèse du NAD est un fait remarquable. Il montre une fois encore la complexité de la corrélation ARN - NAD. Nous reviendrons dans la discussion sur l'interprétation de ce phénomène.

Nos résultats montrent également que l'ATP néoformé n'est pas dilué dans l'ATP ajouté dans le milieu d'incubation. En effet, en présence de NMN, la radioactivité incorporée par µM de NAD est 20 fois supérieure à celle présente dans

l'ATP total. Le pool qui est directement utilisé pour les synthèses nucléaires représente donc vraisembleblament moins que 0,5 µM de ce nucléotide. Des résultats semblables ont été observés dans un milieu acellulaire de pseudomonas par MIZUNO et COLL, (1961) qui ont montré l'existence de plusieurs compartiments pour l'ATP.

En résumé, il est possible de reproduire l'effet de la nicotinamide sur l'ARN dans un système nucléaire in vitro. Ces expériences, non seulement localisent parfaitement la corrélation ARN - NAD, mais, en plus, doivent permettre une étude de son mécanisme. Cependant, avant d'entreprendre cette étude nous devons décrire un autre point capital.

4. EFFET DE LA BENTONITE

Nous avons exposé dans le chapitre consacré au métabolisme nucléique des noyaux isolés l'effet stimulateur de la bentonite sur l'incorporation de l'adénine-C dans l'ARN. Afin d'améliorer nos conditions expérimentales, nous avons recherché l'effet du NMN sur l'ARN en présence de bentonite. Le tableau 20

TABLEAU 20

EFFET DE LA BENTONITE SUR LA CORRELATION ARN-NAD SELON LE PRECURSEUR RADIOACTIF EMPLOYE IN VITRO.

NMN 6 µ moles	Bentonite	µ µmoles adenine-^{14}C * incorp. par mgARN		µ µmoles ac. orotique ^{14}C ** incorp. /mg ARN	
			diff. en p. cent		diff. en p. cent
—	—	1850			
+	—	1020	—45		
—	+	14000		1260	
+	+	21200	+52	880	—30

* 6 uc d'adenine-8-^{14}C; 6 expériences.
** 10 uc d'acide orotique-6-^{14}C; 4 expériences.

confirme que dans ces conditions l'incorporation de l'adénine radio-active est très augmentée, mais, fait surprenant, le NMN a un effet stimulant spécifique sur l'utilisation de l'adénine-C. Si on remplace l'adénine par l'acide orotique qui est précurseur des bases pyrimidiques des acides nucléiques, on retrouve l'inhibition classiquement observée.

Il existe donc un effet paradoxal du NMN en présence de bentonite qui ne s'observe qu'avec l'adénine. Il y a une stimulation de la polymération des nucléotides adényliques. Celle-ci se fait-elle sentir dans toutes les fractions d'ARN nucléaire? Le fractionnement nucléaire selon le procédé précédemment décrit (tableau 21) a montré que le polynucléotide riche en adénine, dont la synthèse est stimulée par le NMN, est toujours localisé dans les mêmes compartiments.

TABLEAU 21

EFFET DE LA BENTONITE SUR LA CORRELATION ARN-NAD AU NIVEAU DES FRACTIONS SUBNUCLEAIRES ET SELON LE PRECURSEUR RADIOACTIF EMPLOYE

Variations en p. cent de la radio activitée incorporée dans l'ARN

EXP. N°	CONDITIONS	ARN So	SUC NUCLEAIRE	ARN-ADN	NUCLEOL. I	NUCLEOL. II
1 **	sans bentonite	—55	—55*	—	—70	—11
	avec bentonite	+40	+540*	—	—28	+2
2 **	sans bentonite	—28	—39	—58	—16	—38
	avec bentonite	+365	—93	—33	—25	+10
3 ***	adenine-^{14} C	+350	—37	—5	—	0
	ac.orotique-^{14} C	—34	—48	—65	—	+33

* Il s'agit de la fraction surnageante du suc nucléaire.
** Avec 6 uC d'adenine-^{14}C.
*** En présence de bentonite.

Nous l'avons trouvé soit dans la fraction d'ARN qui quitte le noyau au cours de l'incubation (So) soit dans le suc nucléaire. Dans ce dernier cas nous avons pû préciser qu'il s'agissait de la fraction surnageante et non des particules ribonucléoprotéiques dont la radio-activité était normalement réduite. Il faut remarquer que les polynucléotides de la fraction nucléolaire II présentent eux aussi un accroissement de l activité incorporée. Les mêmes résultats sont obtenus en comparant l'utilisation de l'adénine et de l'acide orotique en présence de bentonite. Nous pouvons donc conclure que le NMN stimule la formation d'un composé acido-insoluble, riche en nucléotides adényliques et qui serait probablement détruit en l'absence de bentonite par un enzyme du groupe des nucléases.

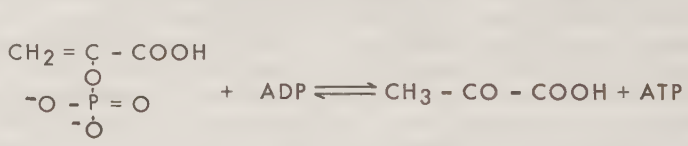
Dans notre laboratoire, CHAMBON, WEILL, MANDEL et COLL, (1963) ont pu montrer que dans une préparation enzymatique, formée par les fractions nucléolochromosomiques de noyaux de foie de rat, le NMN provoquait l'apparition d'une intense activité AMP polymérasique. L'incorporation d'ATP radioactif, en l'absence des autres nucléosides triphosphate, très faible normalement, est stimulée plus de 1.000 fois par l'addition de NMN à la dose que nous avons nous-même utilisé. Le produit de synthèse est très vraisemblablement l'acide polyadénylique, ce phénomène étant spécifique à l'ATP. L'existence d'une AMP polymérase dans les noyaux de cellules de mammifères a été décrite par ABRAMS (EDMONDS et ABRAMS, 1960) mais avec des caractéristiques différentes. Les recherches qui ont été entreprises dans notre laboratoire à l'aide de ce système enzymatique sont encore trop récentes pour expliquer complètement le rôle du NMN. Elles rendent compte cependant des résultats contradictoires que nous avons enregistrés avec l'adénine-^{14}C tant in vitro comme nous venons de le voir, qu'in vivo avec le ^{32}P notamment dans les fractions nucléolaires II et surnageantes. Dans tous les cas, il ne s'agit pas d'une synthèse d'ARN mais d'un polynucléotide dont la signification n'est encore qu'entrevue (BISWAS et ABRAMS, 1962). L'énorme stimulation de l'AMP polymérase par le NMN joue-t-elle un

rôle dans le mécanisme de la corrélation ARN-NAD? On peut le penser au vu de la localisation nucléaire commune des trois enzymes: ARN polymérase, NMN adénylyl transférase et AMP polymérase.

5. ETUDE DU MECANISME DE LA RELATION ARN - NAD

Notre hypothèse de départ reposait sur une compétition entre les synthèses d'ARN et de NAD pour l'ATP qui est leur précurseur commun. Le NMN utiliserait l'ATP nucléaire pour la formation du pyridine dinucléotide et moinsd'ATP serait disponible pour la synthèse des acides nucléiques. Il est évident que si le NMN provoque la formation d'un acide polyadénylique, cette hypothèse se trouve renforcée.

En faisant varier la quantité d'ATP ajoutée dans le milieu d'incubation, on devrait pouvoir influencer la corrélation ARN - NAD. Le tableau 18 indique que l'inhibition de la synthèse d'ARN n'est pas significativement différente en présence de 10 μM ou 20 μM d'ATP alors qu'un excès aussi considérable du précurseur devrait supprimer l'effet compétitif. Cependant nous avons déjà vu que l'ATP ajouté dans le milieu d'incubation n'était pas en équilibre avec le pool actif de l'ATP directement utilisable pour les synthèses nucléaires. Celui-ci est formé grâce à l'énergie des réactions oxydatives qui se produisent dans le noyau. Nous avonc donc essayé de stimuler les oxydations phosphorylantes en introduisant dans le milieu d'incubation un système générateur d'énergie. Le phosphoénolpyruvate de Na en présence de phosphoénopyruvate kinase est utilisé pour la formation d'ATP d'après la réaction:

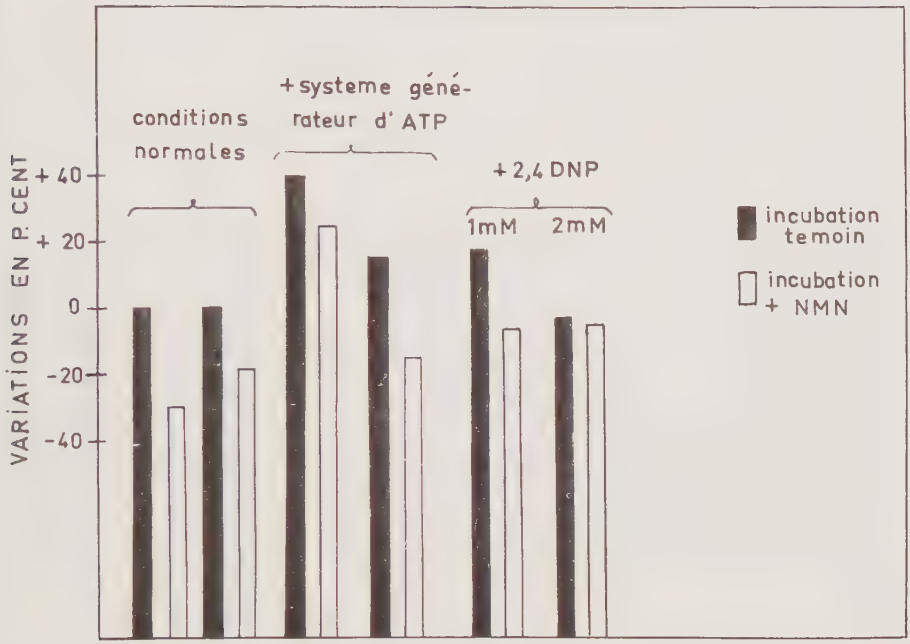


On peut ainsi stimuler la synthèse des liaisons riches en énergie de l'ATP qui se produisent dans le noyau durant l'incubation et donc augmenter le pool actif. L'effet de la synthèse du NAD sur celle de l'ARN devrait être réduit. Nous avons utilisé pour ces essais l'acide orotique 6 ^{14}C-(10 μc) en présence de bentonite. La figure 29 indique que l'addition d'un système générateur d'énergie favorise nettement l'incorporation du précurseur radio-actif dans l'ARN, mais dans toutes les expériences l'effet inhibiteur persiste. La synthèse du NAD est la même que celle observée dans l'incubation témoin (tableau 17).

Nous avons réalisé une contre-épreuve en ajoutant du 2,4 dinitrophénol qui inhibe la formation des liaisons riches en énergie de l'ATP. A faible concentration, le dinitrophénol diminue légèrement la synthèse du NAD; l'inhibition de la synthèse d'ARN reste cependant visible (figure 29). A forte concentration la formation de NAD est supprimée et il n'y a aucun effet du NMN sur la synthèse de l'ARN. Le dinitrophénol ne réduit pas l'incorporation de l'acide orotique dans l'ARN. Il faut cependant noter que nos expériences sont réalisées en présence d'ATP nécessaire pour la synthèse de NAD et que dans ces conditions l'action du dinitrophénol sur la synthèse d'ARN peut être discutée.

FIGURE 29

ROLE DE LA SYNTHESE D'ATP DANS L'EFFET ARN - NAD IN VITRO



Il n'a donc pas été possible par l'étude directe de l'influence de la quantité d'ATP fournie sur la corrélation ARN - NAD de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse de départ étant donné l'existence de divers compartiments de synthèse. La complexité réelle de l'interaction entre le NMN et la synthèse nucléique dans le noyau dont nous avons vu plusieurs exemples exige une connaissance plus détaillée de la constitution du noyau et de son équipement enzymatique. L'interprétation de la composition ARN - NAD trouvera donc sa place dans la discussion générale des faits que nous venons de rapporter.

DISCUSSION

Notre travail avait pour objet une étude de ce qu'il est convenu d'appeler la croissance. Notre but était d'éclaircir le mécanisme biochimique qui est responsable du développement embryonnaire, de l'arrêt de la croissance à l'âge adulte et éventuellement de sa reprise physiologique dans le phénomène de la régénération, ou pathologique dans les processus tumoraux. Nous basant sur une des seules caractéristiques biochimiques qui soit commune à la cellule cancéreuse et à la cellule embryonnaire, c'est-à-dire outre la forte synthèse de protéines et d'ARN, la forte glycose et la faible teneur des coenzymes à pyridine, nous avons recherché les rapports qui existent entre la synthèse d'acides nucléiques et celle du NAD. Dans la discussion de cette étude, nous envisagerons d'abord la biochimie de la croissance qui nous montrera le rôle capital de l'ARN, puis la synthèse des nucléotides à pyridine et enfin, la corrélation ARN - NAD tant du point de vue de son mécanisme que de celui de sa signification biologique.

A. BIOCHIMIE DE LA CROISSANCE: ROLE DE L'ARN

La croissance peut être soit une hypertrophie, c'est-à-dire un accroissement de la masse et du pouvoir fonctionnel des cellules, soit une hyperplasie, c'est-à-dire une multiplication cellulaire. Le premier phénomène correspond à la croissance cellulaire, alors que le second est une croissance tissulaire. Nous nous limiterons à l'étude du prémier.

La croissance cellulaire peut se définir à la fois par l'accumulation des substances fondamentales de la matière vivante qui sont en majorité à base protidique et par une différenciation des structures et des métabolismes pour une fonction déterminée. Ceci correspond à la synthèse d'un équipement enzymatique spécifique. C'est assez dire que le phénomène primordial qui caractérise la croissance est la synthèse protéique et ceci d'autant plus que c'est dans la structure des molécules protéiques que la cellule transcrit l'information génétique contenue dans ses chromosomes. C'est donc par l'étude des moyens dont dispose le tissu vivant pour accomplir et pour contrôler ses synthèses protéiques que l'on peut le mieux aborder les mécanismes de régulation du développement cellulaire.

Les progrès considérables accomplis dans les dernières années ont permis de se représenter avec précision les modalités de la synthèse protéique. Au cours de toutes ces études le rôle de l'acide ribonucléique est apparu comme un fait capital. C'est lui à la fois qui représente la machinerie où se fabrique le polypeptide et qui apporte l'information quant à la nature des chaînes à synthétiser. C'est l'intermédiaire entre le gène et la protéine.

La théorie du rôle de l'ARN dans la synthèse protéique est issue des travaux cyto-chimiques de CASPERSON (1941) et de BRACHET (1941) qui indiquaient que les cellules qui fabriquent le plus de protéines sont les plus riches en ARN. La croissance (VENDRELY, 1946; P. MANDEL et COLL, 1950) ou l'adaptation enzymatique (PRICE, 1952; PARDEE, 1954) s'accompagnent d'une concentration importante d'ARN. Une carence alimentaire en acides aminés, qui bloque la synthèse protéique, s'accompagne d'une chute du taux d'ARN (MANDEL, JACOB et MANDEL, 1950) et d'une inhibition de l'HRC. Mais ce n'est que plus récemment qu'on a pu acquérir la preuve du rôle direct que joue l'acide nucléique grâce à l'étude in vitro de l'incorporation des acides aminés radio-actifs dans les protéines. GALES et FOLKES (1954) ont montré les premiers qu'il fallait de l'ARN pour que cette incorporation se produise. La découverte de la fonction des particules ribonucléoprotéiques de l'ergastoplasme de la cellule animale est due à ZAMECNIK et à ses collaborateurs (1954), tandis que HOAGLAND et COLL, (1957) décrivait l'ARN soluble qui se trouve dans la fraction non sédimentable de la cellule et l'enzyme à pH 5. Les amido-acides marqués sont d'abord activés sous forme d'amino-acyladénylate, puis liés à un ARN soluble (transfert) spécifique qui va les transférer sur le ribosome où se fera la polymérisation. Une protéine ayant toujours une structure moléculaire spécifique qui est déterminée par la séquence des acides aminés dans les chaînes polypeptidiques, il faut que pour chaque protéine l'assemblage des ARN solubles chargés de leur acide aminé soit fait dans un ordre particulier. C'est là qu'intervient l'ARN messager qui se fixerait sur l'ARN des ribosomes et apporterait le message génétique afférent à la formation de chaque protéine. C'est à JACOB et MONOD (1961), GROS et COLL. (1961), SPIEGELMANN et COLL. (1961) ainsi que TISSIERES (1961) que revient la découverte de l'ARN messager et de ses caractéristiques. La synthèse des protéines nécessite donc le concours des trois types d'ARN actuellement connus: l'ARN ribosomique de haut poids moléculaire, l'ARN transfert beaucoup plus petit, et enfin, l'ARN messager dont la structure est une copie de l'ADN. En outre, de l'énergie sous forme d'ATP et de GTP est nécessaire pour toutes ces étapes ainsi que pour la libération dans le liquide cellulaire des protéines formées. L'énergie est fournie par les oxydations phosphorylantes pour lesquelles le facteur essentiel est le NAD.

Le rythme auquel l'ARN est synthétisé va contrôler par conséquent la protéogénèse. On connaît actuellement deux systèmes enzymatiques capables de fabriquer un polynucléotide du type de l'ARN. C'est d'une part la polynucléotide phosphorylase décrite dans les microorganismes par GRUNBERG-MANAGO et COLL. (1955) et dans les noyaux du foie de cobaye par HILMOE et HEPPEL (1957). Cet enzyme utilise les nucléosides diphosphates; il n'est pas capable de former un ARN ayant une structure spécifique et ne semble pas avoir de rôle physiologique dans la synthèse de cet acide nucléique. Au contraire, l'ARN polymérase que OCHOA et COLL. (1961) et HURWITZ et COLL. (1961) ont décrit chez les bactéries et que WEISS (1960) a trouvé dans les noyaux des cellules hépatiques, utilise les nucléosides triphosphates et réalise une copie de l'ADN; elle forme donc ainsi un réel ARN messager. Récemment, YANKOFSKY et SPIEGELMANN (1962) ont montré que l'ADN possédait également un cystron spécifique pour l'ARN ribosomique et probablement aussi pour l'ARN soluble, ceci dans les cellules bactériennes. Il est donc possible que l'ARN polymérase fabrique à la fois les trois types d'ARN cellulaire. Ces résultats semblent s'appliquer à la cellule animale (MERITS, 1963), et confirment donc la théorie de l'origine nucléaire des ARN. Dans notre laboratoire BUSCH et COLL. (1962) ont montré que l'ARN polymérase avait un rôle physiologique certain. Il faut

signaler aussi que des ARN-polymérases qui utilisent l'ARN comme matrice ont été décrits récemment (BURDON et SMELLIE, 1961; NAKAMOTO et WEISS (1962).

Tenant compte de ces données, nous avons orienté nos recherches sur la croissance cellulaire vers l'étude du métabolisme de l'ARN. Cette idée était la conséquence, dans notre laboratoire, de recherches antérieures qui avaient montré que tant durant le jeûne protéique, que durant un traitement à la thyroxine ou dans le phénomène de l'hypertrophie rénale compensatrice, c'était le métabolisme de l'ARN qui était modifié avant que des variations sensibles n'apparaissent dans les protéines. Dans toutes ces recherches, outre le dosage quantitatif de l'ARN, une étude du renouvellement de cet acide nucléique avait été réalisée par la mesure de l'incorporation du ^{32}P dans les chaînes polynucléotidiques. Pour pénétrer dans l'ARN le phosphate radio-actif doit d'abord être incorporé dans le radical phosphoryl en position α dans le nucléoside polyphosphate précurseur de l'ARN. Cette incorporation se fait elle-même à partir des ions PO_4 minéraux par la voie de synthèse connue des nucléotides (KORNBERG et COLL. 1955) ou par les nucléosides kinase (KALCKAR, 1947). Le nucléoside polyphosphate radioactif est ensuite incorporé dans l'ARN par l'un des enzymes décrits plus haut. il existe un renouvellement constant des molécules d'ARN dont le mécanisme n'est pas encore entièrement élucidé. Quoiqu'il en soit la quantité du $^{32}PO_4$ qui pénètre dans les chaînes ribonucléiques est une mesure de l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme de l'acide nucléique. Il s'agit là d'un moyen qui permet de déceler des variations métaboliques alors même que le dosage quantitatif ne révèle aucun changement.

Nous avons choisi pour notre étude le tissu rénal car il présente le phénomène très important de l'hypertrophie compensatrice. L. MANDEL (1955) a montré qu'après la nephrectomie unilatérale on observait dans le rein restant, dès les premières heures, une stimulation précoce de la synthèse d'ARN suivie par une augmentation du taux des protéines et une véritable croissance de toutes les structures rénales. Par comparaison avec le rein prélevé au cours de la néphrectomie, on peut obtenir une évaluation quantitative de ce phénomène, beaucoup plus aisément que si l'on étudie la régénération hépatique. De plus l'organe qui s'hypertrophie n'a pas, dans le cas du rein, été lésé par l'acte chirurgical.

L'hypertrophie rénale compensatrice reste pendant le premier mois un phénomène d'accroissement cellulaire pur. L'hyperplasie, marquée par une synthèse d'ADN, n'apparaît que tardivement.

L'étude de la synthèse d'ARN, par l'emploi des précurseurs radioactifs, par le dosage quantitatif dans le rein normal et durant l'hypertrophie rénale compensatrice, nous a semblé un outil de choix pour des recherches sur la croissance cellulaire.

B. SYNTHÈSE DU NAD

Afin de déterminer le rôle que peuvent jouer physiologiquement les coenzymes à pyridine dans la régulation du développement cellulaire, nous avons utilisé le procédé décrit par KAPLAN et COLL. (1956) qui permet de stimuler in vivo la production de NAD. L'injection de nicotinamide, à une dose comprise entre 500 et 1.000 mg/kg de poids animal, provoque une élévation de la synthèse du NAD et du NADP dans les organes de la souris. Ainsi, dans le rein de cet animal, le taux des coenzymes s'élève au bout de 13 heures à une valeur

2,1 x supérieure à la normale. Dans nos essais sur le tissu rénal du rat, le maximum est atteint dans les mêmes délais et ce taux est multiplié par 5,3. Un jour après l'injection, le retour à la normale n'est pas encore totalement réalisé. La comparaison des dosages fluorométrique et enzymatique permet de distinguer le NAD, qui, seul, réagit avec l'alcool deshydrogénase, du NADP. 90 % des coenzymes synthétisés sont sous forme de NAD. Nous n'avons pas recherché les coenzymes réduits, mais KAPLAN et COLL. (1956) indiquent qu'ils ne subissent pas de variation.

Cette même équipe de biochimistes a montré quel était le mécanisme de l'accumulation de NAD. Il est possible que la nicotinamide, qui est un inhibiteur de la NADase agisse en bloquant cet enzyme: moins de NAD serait alors détruit et la cellule emmagasinerait le coenzyme. Cette hypothèse peut être exclue car la nicotinamide injectée n'est pas stockée dans le tissu mais immédiatement transformée en nucléotide et ensuite l'activité NADasique n'est pas modifiée après l'administration de la vitamine PP. Il s'agit donc d'une réelle synthèse de NAD. Le mécanisme de cette synthèse a été élucidée par LANGAN, KAPLAN et SHUSTER (1959). Se basant sur les travaux de PREISS et HANDLER (1958), ils ont montré que les réactions suivantes sont nécessaires :

$$\text{Nicotinamide} + \text{PRPP} \longrightarrow \text{NMN} + \text{pyrophosphate} \quad (1)$$

$$\text{NMN} \longrightarrow \text{NaMN} + NH_3 \quad (2)$$

$$\text{NaMN} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{NaAD} + \text{pyrophosphate} \quad (3)$$

$$\text{NaAD} + \overset{NH_3 + \text{ATP}}{\longrightarrow} \text{NAD} + \text{AMP} + \text{pyrophosphate} \quad (4)$$

$$\text{NAD} + \text{ATP} \longrightarrow \text{NADP} + \text{ADP} \quad (5)$$

La réaction (2) a été récemment démontrée chez les mammifères par SARMA et COLL. (1961). L'enzyme qui catalyse la réaction (3) est, lorsqu'il s'agit d'un tissu animal, localisé dans le noyau cellulaire (PREISS et HANDLER, 1958). C'est probablement la coenzyme I pyrophosphorylase de KORNBERG (1950) dont HOGEBOOM et SCHNEIDER (1952) ont décrit la présence dans les noyaux des cellules hépatiques. Les autres enzymes sont cytoplasmiques. Il y a donc une migration intracellulaire des nucléotides précurseurs dans la synthèse des coenzymes à pyridine.

La fraction adénylique du NAD formé est synthétisée de novo après l'administration de la nicotinamide. On peut suivre la formation d'adénine par la mesure de l'absorption dans l'UV de la fraction acidosoluble du tissu (E_{260}). Au cours de la synthèse de NAD, induite par la nicotinamide, il se produit une stimulation de l'incorporation du formiate-^{14}C et du glycocolle-^{14}C (SHUSTER et GOLDIN, 1959) ainsi que du glucose-1-^{14}C (SHUSTER et GOLDIN, 1958) dans l'AMP. Il n'y a pas d'accumulation d'AMP libre. Les nucléotides adényliques formés sont immédiatement utilisés pour la formation du NAD. La comparaison des activités spécifiques de l'AMP présent dans le NAD et de l'AMP libre montrent que celui-ci est d'abord phosphorylé en ATP avant d'être incorporé dans le coenzyme.

L'injection de nicotinamide provoque donc une véritable néosynthèse des dinucléotides à pyridine. Bien que le précurseur normal soit l'acide nicotinique (PREISS et HANDLER, 1958) l'injection de ce composé n'a pas l'action de son dérivé amidé. En effet, il existe une réaction de feedback qui inhibe la synthèse du coenzyme I en présence d'un excès d'acide nicotinique. L'administration de nicotinamide ne provoquerait pas d'accumulation de l'acide correspondant, car la réaction de la désamidation serait lente; son rôle stimulateur s'expliquerait ainsi (LANGAN, KAPLAN et SHUSTER, 1959). Un tel mécanisme de feedback a été décrit récemment chez les bactéries par IMSANDE et PARDEE (1962).

C. L'ÉQUILIBRE ARN - NAD

Nos résultats indiquent clairement qu'une augmentation de la synthèse du NAD, inhibe l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN du rein au repos. Dans le rein restant, 24 heures après une néphrectomie unilatérale, on observe pour le renouvellement de l'ARN la sommation des effets stimulateurs de l'hypertrophie et des effets inhibiteurs de la synthèse du NAD. Ceci révèle déjà une certaine forme d'équilibre entre la croissance et la formation des coenzymes à pyridine. Cette notion se confirme si on considère l'action inhibitrice de la nicotinamide sur les synthèses d'ARN et de protéines qui se produisent au cours d'une hypertrophie rénale de plus longue durée. Nous avons pû montrer que l'augmentation d'ARN est inversement proportionnelle à la quantité de NAD synthétisée. Cette relation linéaire que l'on peut mettre en évidence dans un tissu où les métabolismes impliqués sont tous les deux stimulés, existe vraisemblablement aussi dans les conditions normales. De toute manière, cette corrélation démontre l'existence d'un équilibre ARN - NAD dans la cellule rénale. Elle nous permet d'interpréter la réduction du renouvellement de l'ARN consécutive à l'injection de nicotinamide comme une manifestation de cet équilibre. La diminution dans le rein en hypertrophie, de la synthèse du NAD en est encore un aspect important.

La mise en évidence de ce phénomène soulève trois ordres de problèmes:

1) la localisation intracellulaire de l'équilibre ARN - NAD;
2) son mécanisme;
3) sa signification éventuelle dans la régulation de la croissance.

Ce sont ces points que nous allons envisager successivement.

1. LOCALISATION

En réduisant le délai entre l'administration de la nicotonamide et le sacrifice on peut observer une nette réduction du métabolisme de l'ARN nucléaire alors qu'aucune variation n'est enregistrée dans le cytoplasme. La corrélation ARN - NAD est donc nucléaire. L'appareil nucléolochromosomique contient à la fois un système enzymatique capable de former l'ARN et la NMN-adénylyl transférase. L'incubation in vitro des noyaux, en présence de NMN et d'adénine-8-^{14}C ou d'acide orotique--6-^{14}C, permet de démontrer que la manifestation de l'équilibre ARN - NAD ne nécessite pas l'intervention du cytoplasme. C'est un phénomène strictement nucléaire.

Les expériences in vivo nous ont montré que la synthèse de l'ARN ribosomique, que l'on trouve dans les noyaux, est abaissée par l'injection de nicotinamide. Le nucléole contiendrait (voir page 55) de l'ARN ribosomique néoformé, constituant le nucléolomène et qui passerait ensuite dans les ribosomes nucléaires et enfin dans le cytoplasme. On conçoit ainsi qu'une inhibition de la synthèse de l'ARN ribosomique dans l'appareil nucléolochromosomique peut retentir sur le métabolisme de l'ergastoplasme cellulaire, ralentir la synthèse protéique et donc la croissance. Il apparaît, en effet, que 24 heures après l'injection de l'amide nicotinique, c'est dans l'ARN ribosomique cytoplasmique que la réduction de l'incorporation du $^{32}PO_4$ est la plus importante.

Dans nos expériences in vitro, nous avons constaté que la fraction So, qui correspondrait à l'ARN messager, incorporait moins d'acide orotique en présence du NMN que dans l'incubation témoin. Ceci s'opposerait aux observations que nous avons faites in vivo avec le $^{32}PO_4$, où nous avions observé plutôt une augmentation de la radioactivité des fractions d'ARN messager. La présence de l'acide polyadénylique dont la formation est très stimulée par le NMN dans les compartiments nucléaires où on trouve également l'ARN messager, rend difficile l'interprétation de ces phénomènes. Il est possible en effet que les augmentations de l'A.S. de certaines fractions de l'ARN nucléaire soient dues uniquement à la synthèse du poly A alors que la formation d'ARN messager serait inhibée. L'ultracentrifugation en gradient de saccharose des ARN isolés après incubation des noyaux avec l'adénine-^{14}C en absence de bentonite nous a montré effectivement que la formation d'ARN labile est diminuée durant la synthèse du NAD. On ne peut donc pas exclure que la régulation ARN - NAD se manifeste dans l'ARN messager autant que dans l'ARN ribosomique (fig. 25).

La chromatographie sur albumine - méthylée des ARN nucléaires isolés dans les reins d'animaux ayant de la nicotinamide fournit une fraction supplémentaire (fraction radioactive IV) qui possède une activité spécifique élevée. Cette fraction qui n'existe pas normalement, correspond peut-être à l'acide polyadénylique formé. La colonne de HERSHEY retient plus les ARN riches en adénine ou en uracile que les autres; la fraction IV est effectivement éluée bien après les autres types d'ARN.

La localisation intranucléaire de la corrélation ARN - NAD pose un problème important: celui des relations nucléocytoplasmiques. Une inhibition de la biosynthèse des ARN nucléaires produit rapidement dans toute la cellule les importantes perturbations que nous avons décrites. Il faut donc envisager une influence prépondérante du noyau sur le reste du protoplasme.

Se basant sur le fait que l'incorporation des précurseurs radioactifs dans l'ARN était plus importante et plus précoce dans le noyau (MARSHAK, 1948; WEILL et COLL. 1957; voir revue dans SIEBERT et SMELLIE, 1957 et dans PRESCOTT, 1960), la majorité des biochimistes ont considéré l'ARN nucléaire comme le précurseur des ARN cytoplasmiques; selon certains (ZALOKAR, 1959; PERRY et COLL. 1960) tout l'ARN cytoplasmique serait d'origine nucléaire. Cependant, nombre de faits expérimentaux s'opposent à cette conception. Des études cinétiques ont montré que l'ARN nucléaire ne pouvait être le précurseur direct de l'ARN cytoplasmique (BARNUM et HUSEBY, 1953; HARRIS et WATTS, 1962); le maintient dans les cellules énucléees d'une synthèse d'ARN (BRACHET et SZAFARZ, 1953; SCHWEIGER et BREMER, 1960; STRAUS et GOLDWASSER, 1961) s'oppose à l'hypothèse d'une origine strictement nucléaire. Enfin, les différences de composition en nucléotides entre les ARN du noyau et du cytoplasme (CROSBIE, SMELLIE et DAVIDSON, 1953; ELSON, TRENT et CHARGAFF, 1955) pose également des problèmes. Cependant il ne s'agit que de différences quantitatives dans la distribution de différents types d'ARN ayant une répartition différente des nucléotides. Il est acquis en effet aujourd'hui qu'il existe plusieurs ARN dans la cellule possédant des compositions en base très dissemblables: on trouve dans le noyau cellulaire les mêmes types d'ARN que dans le cytoplasme; la dernière objection est donc dépassée (GEORGIEV et COLL, 1962). Même s'il existe une synthèse d'ARN en dehors du noyau, la croissance, la synthèse protéique et la différenciation restent sous la dépendance d'un facteur nucléaire qui doit être de nature ribonucléique (ERRERA et VANDERHAEGHE, 1957). PERRY, HELL et ERRERA (1961) ont pu démontrer directement qu'une importante fraction de l'ARN

cytoplasmique (60%) était sous la dépendance du nucléole. L'énucléation ou la destruction in situ du nucléole rend les cellules incapables de maintenir un métabolisme nucléique ou protéique normal. Nos expériences réalisent de la même façon une altération dans la formation de l'ARN nucléaire qui rapidement se répercute dans l'ensemble de la cellule et aboutit à une inhibition globale de la synthèse de l'ARN. Cette altération nucléaire rend également le rein incapable de s'hypertrophier et donc de s'adapter à un état physiologique nouveau. Nos conclusions seront donc orientées vers un réel contrôle du noyau sur le fonctionnement cellulaire surtout en ce qui concerne la synthèse protéique.

Le développement de nos connaissances dans ce domaine jette une lumière nouvelle sur le problème des relations nucléo-cytoplasmiques. L'information génétique est transférée par l'ARN messager de l'ADN aux microsomes où elle dirige la formation des protéines spécifiques. C'est là un exemple qui pourrait être aussi bien appliqué à l'ARN ribosomique qu'à l'ARN transfert (GEORGIEV et COLL, 1961; JACOB et SIRLIN, 1962). Il existe certainement une relation nucléo-cytoplasmique pour chacun des types d'ARN connus. On peut supposer, en accord avec nos observations, que la synthèse d'ARN ribosomique règle l'intensité de la synthèse protéique; l'ARN messager déterminant plutôt la nature des protéines formées. Au sein même du noyau la synthèse des ARN est soumise à certaines régulations dont nous avons cherché à élucider un aspect.

2. MECANISME

La localisation nucléaire de l'équilibre ARN - NAD que nous avons pu démontrer, éclaire sensiblement le mécanisme biochimique en cause. La présence du cytoplasme n'est pas nécessaire si on utilise le NMN comme précurseur du NAD à la place de la nicotinamide. Ceci permet d'exclure d'emblée un processus qui serait fondé sur une intoxication cellulaire par la vitamine PP. L'élimination de cette vitamine nécessite une méthylation. Des doses importantes de nicotinamide pourraient provoquer une carence en groupements - CH_3, c'est-à-dire, en méthionine. Il est évident qu'une telle carence suffirait à provoquer des troubles du métabolisme nucléoprotéique. Ainsi, HANDLER et DANN (1942) ont montré que l'administration per os de nicotinamide provoquerait un ralentissement de la croissance du jeune rat qui peut être prévenue par un régime riche en méthionine. Dans nos expériences, l'alimentation de nos animaux était réalisée à l'aide d'un aliment complet contenant de la méthionine; de plus, nous avons ajouté de la choline, qui fournit également des groupements - CH_3. De toutes manières, les expériences in vitro avec le NMN montrent qu'en aucun cas l'équilibre ARN - NAD ne peut être attribué à l'effet décrit par HANDLER et DANN (1942).

La dépression de la biosynthèse de l'ARN ne se fait que lorsqu'une formation de coenzyme I a effectivement lieu dans le noyau. La localisation nucléolochromosomique de l'ARN polymérase et de la NMN-adénylyl transférase fait penser à une interaction directe entre ces deux systèmes enzymatiques. Nous avons mesuré l'activité ARN-polymérasique des noyaux rénaux selon la méthode décrite par BUSCH et COLL, (1962) utilisant une préparation nucléaire non purifiée. L'administration de la nicotinamide à la dose usuelle ne provoque aucune modification de la quantité d'UTP-^{32}P incorporée dans l'ARN. La corrélation ARN - NAD n'est donc pas basée sur un phénomène purement enzymatique.

Nous pensons qu'il s'agit d'une compétition pour l'ATP. La nécessité des nucléosides triphosphates pour la synthèse de l'ARN a été démontrée par MAN-

DEL et COLL, (1959) avant la découverte de l'ARN polymérase; elle reste donc acquise même si le rôle de l'enzyme n'est pas encore pleinement élucidé. La synthèse du NAD à partir du NMN se fait grâce à l'ATP. SHUSTER et COLL, (1959) ont montré que l'administration de la nicotinamide provoque une stimulation de l'incorporation du formiate-^{14}C dans l'adénine des composés acido-solubles, dans le NAD et dans l'ARN. C'est donc qu'il existe un précurseur adénylique commun pour l'ARN et pour les coenzymes à pyridine. Pour assurer la formation du NAD, le tissu doit augmenter sa synthèse de novo d'adénine; l'utilisation du formiate-^{14}C sera donc accrue. Les nucléotides formés, de forte activité spécifique, sont alors utilisés pour toutes les réactions nécessitant un précurseur adénylique. Il faut remarquer que l'augmentation de l'incorporation du formiate dans l'ARN ne s'oppose pas à nos observations: il s'agit là d'un accroissement de la néosynthèse d'adénine qui est normalement faible dans les tissus animaux (TYNER et COLL, 1953) dont on retrouve un reflet dans l'ARN. Il ne s'agit pas d'une augmentation du métabolisme de l'acide nucléique. Les expériences de SHUSTER, que nous avons mentionné ont été réalisées à des délais trop courts après l'administration de la nicotinamide pour qu'une inhibition de la synthèse d'ARN soit déjà visible. Ainsi, l'équipe de KAPLAN (SHUSTER et GOLDIN, 1958) n'a jamais pu observer de varaitions dans l'ARN après l'injection de l'amide nicotinique.

En accord avec les observations de SHUSTER et GOLDIN (1959), nous avons observé que dans les noyaux isolés, incubés in vitro avec le NMN, l'incorporation de l'adénine-^{14}C dans l'ATP était augmentée. La formation du NAD, utilisant dans les réserves nucléaires une quantité importante de nucléotides adényliques, déplace la réaction:

adénine-^{14}C + PRPP ⟶ ^{14}C-AMP + pyrophosphate

dans le sens d'une formation accrue d'AMP radioactif.

La compétition ARN - NAD n'est donc pas basée sur un manque d'AMP mais sur le taux des phosphorylations dans le noyau. La transformation de l'adénosine monophosphate en triphosphate se faisant grâce à l'énergie fournie par le métabolisme intermédiaire, la quantité d'ATP nucléaire doit être limitée. En effet, il est établi que le noyau se comporte de façon autonome du point de vue énergétique (MITCHELL, 1960). Alors que le cytoplasme dispose du système mitochondrial qui synthétise trois liaisons phosphorées riches en énergie de l'ATP par atome d'oxygène utilisé, le noyau ne possède aucune structure comparable. SIEBERT (1960) pense que l'ATP nucléaire provient plus des réactions anaérobies de la glycolyse que des oxydations phosphorylantes. Cependant ALLFREY, MIRSKY et OSAWA (1957) ont montré que, dans les noyaux isolés du thymus, la synthèse d'ATP était sensible aux inhibiteurs classiques des transports d'électrons mitochondriaux. La présence d'ADN, ou d'un polyélectrolyte de charge similaire, est indispensable (ALLFREY et MIRSKY, 1957). Quelle que soit la nature du métabolisme énergétique nucléaire, il est certain qu'il s'agit d'un processus particulier au noyau. Ainsi SIEBERT et COLL, (1961) a pu montrer que dans les premiers stades de la régénération hépatique on assistait à une activation de la glycolyse dans le noyau et au contraire, à une réduction de cette activité dans le cytoplasme. En tout cas, le noyau produit lui-même l'énergie dont il a besoin pour ses synthèses nucléoprotéiques. Nous avons pu vérifier, dans les noyaux rénaux in vitro, que le pool actif de l'ATP nucléaire n'était pas en équilibre avec l'ATP extra-nucléaire. On peut admettre que la perméabilité de la membrane nucléaire jouerait un rôle régulateur dans le fonctionnement cellulaire.

Selon l'activité des systèmes qui fournissent l'énergie à la synthèse de l'ATP, le noyau serait ou ne serait pas capable d'assurer à la fois une synthèse importante d'ARN ou de NAD. Le potentiel énergétique d'un tissu est lié principalement au taux des coenzymes à pyridine qu'il contient. On peut donc envisager un mécanisme d'auto-régulation: l'ATP étant nécessaire pour la formation du NAD et ce dernier étant capital pour le fonctionnement des synthèses fournissant de l'ATP (MORTON, 1958).

Mais cette régulation n'est pas strictement nucléaire. Le noyau, en effet, ne produit que du désamido-NAD; l'amidation se fait dans le cytoplasme. La perméabilité de la membrane nucléaire pour le NAD doit donc être un élément important de ce mécanisme.

L'équilibre ARN - NAD dépend donc des phénomènes oxydatifs qui produisent l'ATP. Dans un tissu riche en énergie, l'administration de la nicotinamide devrait provoquer une inhibition du métabolisme de l'ARN plus faible que dans un tissu dont les ressources énergétiques sont inférieures. Nous avons, en effet, constaté que pour observer les mêmes phénomènes au niveau de l'ARN les doses de nicotinamide nécessaires dans le foie sont doubles de celles dans le rein. Le mécanisme de contrôle en retour, que nous avons évoqué, peut aussi expliquer pourquoi l'administration prolongée de vitamines PP pendant 5 jours ne provoque pas de diminution de la quantité absolue d'ARN dans le rein au repos malgré le ralentissement important du renouvellement de l'ARN qui se produit dans les premières 24 heures. Le NAD néoformé augmenterait la production de l'ATP et la cellule pourrait rétablir un métabolisme nucléique normal. Dans un tissu en croissance, où les besoins en ATP pour la synthèse de l'ARN sont très élevés, cette auto-régulation ne peut pas jouer et la croissance s'arrête. C'est ce que nous avons observé dans l'hypertrophie rénale compensatrice. L'absence de variations de la quantité d'ARN après traitement par la nicotinamide peut relever aussi d'une modification du catabolisme de cet acide nucléique.

L'hypothèse d'une compétition entre les systèmes enzymatiques synthétisant le NAD et l'ARN pour l'ATP rencontre pourtant des obstacles. Il y a en effet une grande disproportion entre les quantités d'ARN et de NAD dans le tissu rénal: pour 100 g de rein il y a environ 1mM de nucléotides ribonucléiques et seulement 50 μM de coenzymes I. Dans le noyau, où doit se situer le mécanisme envisagé, il n'y a que 2% des nucléotides à pyridine cellulaire (JACOBSON et COLL, 1957) mais 8% de l'ARN total. La différence est donc encore plus forte. Cependant, le renouvellement des coenzymes à pyridine est élevé et toutes les molécules de NAD de la cellule ont été synthétisées dans le noyau. STOLLAR et KAPLAN (1961) ont montré que l'incorporation de $^{32}PO_4$ dans le NAD était plusieurs fois supérieure dans le noyau que dans les autres fractions subcellulaires. Il existe donc une synthèse intense du dinucléotide qui pourrait rendre compte de la compétition. Celle-ci dépendra dans une grande mesure de la constante d'équilibre des deux réactions qui entrent en corrélation. RUTMANN et GEORGES (1961) ont montré par le calcul des énergies libres que la synthèse du NAD à partir du NMN et de l'ATP était thermo-dynamiquement beaucoup plus favorable que la synthèse de l'ARN ou de l'ADN. Le NMN même à des taux très faibles peut donc entrer en compétition avec la synthèse des acides nucléiques.

Cependant, il ne semble pas que le mécanisme de la corrélation ARN - NAD soit aussi simple. CHAMBON, WEILL, MANDEL et COLL, (1963), dans ce laboratoire, ont constaté que le NMN était un activateur d'une AMP polymérase. Nous avons nous-même observé des phénomènes analogues. In vitro, avec les

noyaux rénaux isolés, en présence de bentonite, le NMN stimule de façon importante l'incorporation de l'adénine-^{14}C dans un composé acido-insoluble que l'on retrouve dans le liquide surnageant du noyau et dans le milieu d'incubation et dont l'origine semble être dans la fraction nucléolaire II. Ce phénomène n'est pas observé avec l'acide orotique-^{14}C. In vivo, l'injection de nicotinamide stimule l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans la fraction nucléolaire II et dans le liquide surnageant nucléaire. Il nous semble justifié d'interpréter ces résultats par l'action du NMN sur l'AMP polymérase.

Quelle peut être la signification de cette propriété du NMN et a-t-elle un rapport avec l'équilibre ARN - NAD? Aucune réponse complète ne pourra être fournie avant d'avoir analysé les systèmes enzymatiques en présence. Cependant, si le précurseur du NAD provoque une mobilisation importante de l'ATP pour la synthèse d'un acide polyadénylique, il réduit encore davantage le pool d'ATP nucléaire. Le mécanisme de la corrélation ARN - NAD est peut-être basé plus sur une compétition pour l'ATP de l'ARN polymérase qu'avec la nicotinamide mononucléotide-adénylyl transférase; l'objection quant à la faible quantité de NAD par rapport à l'ARN serait ainsi écartée.

L'étude directe du mécanisme de l'équilibre ARN - NAD s'est avérée difficile. Nous avons déjà signalé que le pool d'ATP actif du noyau n'est pas en relation avec le milieu extérieur. Ceci explique l'échec de nos tentatives de démonstration directe du rôle de l'ATP. Nous n'avons pas pu montrer en effet avec certitude que l'effet ARN - NAD dépendait de la quantité d'ATP présente dans le milieu d'incubation. Pourtant, l'absence d'ATP externe inhibe totalement la synthèse du NAD. Ceci indiquerait que le nucléotide pénètre dans une certaine mesure dans le noyau. Mais il est possible également que le seul rôle de l'ATP extérieur soit de permettre le transport actif du NMN à travers la membrane nucléaire et de fournir au noyau une réserve d'AMP. Le dinitrophénol qui bloquerait dans le noyau les oxydations phosphorylantes (ALLFREY, MIRSKY et OSAWA, 1957) inhibe la synthèse du NAD mais pas la synthèse de l'ARN. A l'opposé, le système producteur d'énergie à base de phosphoénolpyruvate stimule l'incorporation de l'acide orotique dans l'ARN. Là aussi il peut s'agir d'une amélioration du transport actif du précurseur dans la membrane nucléaire. Nous ne savons pas en effet si l'ATP formé par ce système pénètre dans le noyau. L'équilibre ARN - NAD n'est pas, néanmoins, modifié significativement. Ceci illustre la difficulté de dégager le mécanisme d'une régulation enzymatique avant de connaître à fond la structure et la fonction du tissu intéressé.

En résumé les données que nous avons discutées qui proviennent tant de nos résultats expérimentaux que de la littérature biochimique récente, sont en faveur de l'hypothèse que nous avons formulée. Il existe une compétition entre l'enzyme responsable de la synthèse de l'ARN nucléaire et la NMN adénylyl transférase (et éventuellement d'autres enzymes) pour l'ATP produit par les phénomènes oxydatifs intranucléaires.

3. SIGNIFICATION DE L'EQUILIBRE ARN - NAD

L'augmentation expérimentale de la synthèse du NAD nous a permis d'inhiber le renouvellement de l'ARN. L'hypertrophie rénale compensatrice est fortement réduite par l'injection de nicotinamide. Vice versa, la formation des

coenzymes à pyridine est plus faible dans la cellule en croissance que dans la cellule au repos. L'équilibre ARN - NAD s'il existe physiologiquement dans la nature doit donc être un rouage important du mécanisme régulateur de la croissance.

La définition de ce phénomène physiologique si familier qu'est la croissance est difficile à dégager. Von BERTALANFFY (1960) propose celle-ci: "La croissance est l'accroissement quantitatif d'un système vivant qui résulte de la prédominance de l'anabolisme des matériaux de construction cellulaire sur leur catabolisme". Ces matériaux de construction sont des composés possédant une structure spatiale complexe, spécifique du tissu qui les produit; dans ce groupe les macromolécules telles que les acides nucléiques et les protéines tiennent la place principale. Mais la croissance possède au moins trois aspects différents. D'abord l'hypertrophie cellulaire: il s'agit d'un accroissement des constituants cytoplasmiques qui se traduit par une augmentation du taux de l'ARN et des protéines. Ensuite, l'hyperplasie tissulaire, c'est-à-dire la multiplication des cellules d'un organe, c'est l'ADN qui permet de suivre ce phénomène. Enfin, la différenciation qui s'accompagne de l'apparition d'une fonction biologique déterminée dépendant de la nature du tissu envisagé: on la mesurera par l'étude d'une activité enzymatique, nerveuse, etc... Si ces trois phases font partie de la croissance, elles ne sont pas pourtant contemporaines. Lorsque la synthèse d'ADN qui permettra la division cellulaire, se produit, la formation d'ARN est arrêtée (PRESCOTT, 1960). Pendant l'interphase, l'ADN présente une remarquable stabilité alors que les synthèses protéiques sont intenses et que le protoplasme s'accroît. Enfin, l'acquisition d'une fonction cellulaire hautement différenciée s'accompagne, en général, de l'arrêt de la croissance.

Dès 1932, SCHMALHAUSEN développe une théorie de la régulation du développement basée sur l'opposition croissance-différenciation. Les cellules qui s'accroissent sont différenciées et l'adaptation à une fonction biologique déterminée s'accompagnent d'une perte de la fertilité cellulaire. Cette notion semble avoir perdu une grande partie de sa signification. Les tissus différenciés sont capables de reprendre leur croissance s'ils sont soumis à un facteur extérieur: traitement hormonal (à la thyroxine, par exemple) ou stimulus chirurgical (dans la régénération hépatique ou l'hypertrophie rénale compensatrice) (Von BERTALANFFY, 1960). Normalement cependant, les cellules des tissus comme le foie, le rein ou le cerveau ne se multiplient pas. De plus, dans la croissance cancéreuse la dédifférenciation cellulaire est de règle. Il existe donc certainement un mécanisme régulateur qui est en liaison avec le métabolisme de la cellule. C'est principalement l'étude de la tumeur maligne qui a provoqué l'éclosion de nouvelles hypothèses. Se basant sur ses travaux commencés vers 1930, WARBURG (1956) propose un mécanisme basé sur les rapports entre les synthèses cellulaires et les systèmes producteurs d'énergie. La caractéristique du cancer serait une lésion irréversible de la respiration cellulaire avec, dans un second temps, une adaptation des cellules à une vie anaérobie où la fermentation fournirait seule l'énergie nécessaire à la vie. Dans ces conditions la différenciation cellulaire ne peut être maintenue et la cellule acquiert ses caractéristiques cancéreuses dont la principale est le pouvoir de prolifération anarchique.

Cette théorie célèbre a été fortement critiquée. WEINHOUSE (1956) a montré que la cellule cancéreuse ne présentait aucune lésion du système respiratoire. La production d'ATP par les phénomènes oxydatifs mitochondriaux n'est pas diminuée. De nombreux travaux sont venus appuyer les objectifs de WEINHOUSE à la théorie de WARBURG. EI'TSINA (1960) observe dans la cellule cancéreuse une phosphorylation de l'ADP d'intensité normale tant durant la respiration que

durant la glycolyse. L'addition de glucose dans le milieu d'incubation diminue la respiration et stimule la glycose: c'est l'effet CRABTREE. De plus, la respiration endogène, sans glucose, n'est pas capable de maintenir le taux d'ATP constant alors que la glycolyse provoque une formation de novo du nucléotide. S'opposant à l'hypothèse de WARBURG, EL'TSINA écrit: "la caractéristique du métabolisme de la cellule cancéreuse n'est pas une réduction de l'énergie produite par la respiration, mais l'apparition d'une glycolyse qui fournit la majorité de l'ATP nécessaire". L'apparition dans les cellules en culture d'un effet CRABTREE et d'une glycolyse qui n'existe pas danx les cellules fraîchement trypsinées (GERSHANOVICH et COLL. 1958) montre que les observateurs d'EL'TSINA peuvent s'appliquer à toutes les cellules en prolifération. QUASTEL et BICKIS (1959) ont montré que le rapport P/O des cellules cancéreuses était normal mais qu'un important effet CRABTREE était observable. Mieux encore, ils ont mesuré l'incorporation du glycocolle ^{14}C dans les protéines dans des tissus adultes, embryonnaires et cancéreux et ils évaluent l'efficacité par molécule d'ATP des divers métabolismes énergétiques pour la synthèse d'ATP. L'efficacité est beaucoup plus élevée dans les tissus à croissance rapide. Dans le cas de la tumeur cancéreuse, la glycolyse anaérobie est plus efficace que la respiration; dans les cellules normales, au contraire, c'est la glycolyse aérobie qui permet la meilleure incorporation du glycocolle. Pour expliquer les différences avec l'état adulte, l'efficacité très faible de la croissance, il déclare: "Il peut s'agir dans les tissus adultes du développement de nouveaux systèmes qui utilisent l'ATP pour les fonctions spécialisées de la cellule". Moins d'ATP serait alors disponible pour le système de la synthèse protéique.

QUASTER et BIKIS fondent donc une théorie qui ne se limite pas à la cellule cancéreuse mais qui englobe la croissance normale. POTTER (1946) proposait déjà une théorie semblable mais sans pouvoir apporter d'arguments expérimentaux. Selon lui, la croissance serait maintenue dans les limites normales par une carence en un précurseur des acides nucléiques qui serait en relation également avec les mécanismes de transfert d'énergie. Parmi les facteurs du métabolisme énergétique qui diffèrent des tissus en croissance aux tissus normaux, il indique que le point principal est sans doute la réduction du taux des codéshydrogénases. A l'appui de cette thèse il faut citer un grand nombre de travaux qui montrent que les tissus néoplasiques sont pauvres en NAD: KENSLER et COLL. (1940); FISCHER et SCHLENK (1948); CARRUTHERS et SUNTZEFF (1953); JEDEIKIN et WEINHOUSE (1955); GLOCK et Mac LEAN (1957); MANDEL et COLL. (1961). La même constatation est valable pour le flavineadénine dinucléotide (ROSENBERG, 1959). Ce point important est à la base de l'hypothèse émise par MORTON (1958). Considérant le rôle que le noyau cellulaire doit avoir dans la régulation de la croissance, il attribue une grande importance aux coenzymes à pyridine, qui, synthétisés dans le noyau, conditionnent le métabolisme énergétique de toute la cellule. L'activité de la NMN adénylyl transférase est faible dans les tissus embryonnaires et augmente progressivement au cours du développement. Elle est très réduite également dans les tumeurs. MORTON suppose qu'il existe un mécanisme qui déclenche la division cellulaire lorsque la taux de NAD par unité de masse cytoplasmique tombe au-dessous d'une certaine valeur. Si la production de NAD augmente avec la croissance, la quantité de protoplasme élaborée entre deux divisions cellulaires augmente et le rapport nucléo-cytoplasmique décroit. A un certain moment, le taux du NAD ne s'abaisse plus au dessous de la valeur critique et la multiplication cellulaire s'arrête. Le cancer serait caractérisé par une atteinte génétique du système enzymatique nucléaire qui forme le NAD. La division cellulaire deviendrait anarchique et les cellules formées auraient un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, ce qui correspond bien à un processus malin.

WARAVDEKAR et POWERS (1957) ont montré que l'activité de la nicotinamide mononucléotide-adénylyl transférase était diminuée dans le sang et les organes chez les animaux porteurs d'une tumeur cancéreuse. Ce phénomène disparaît très rapidement après l'abblation de la tumeur. Il y aurait donc une substance circulante qui inhibe la formation du NAD. Ces faits bien qu'en opposition avec les expériences de MORTON (1958) ont été repris par KARA et SORM (1959) qui ont tenté d'expliquer la diminution de la synthèse du coenzyme chez les animaux cancéreux par une augmentation des adénosines triphosphatases. Mais leur démonstration in vitro est en contradiction avec l'observation que, in vivo, le taux d'ATP est plutôt augmenté dans les tissus cancéreux (SCHMITZ et SAUKKONEN, 1955; EL'TSINA, 1959; MANDEL, non publié). La diminution du taux des coenzymes à pyridine dans les tissus à prolifération rapide doit donc être attribuée à une réduction de l'activité de la NMN adénylyl transférase. Elle ne saurait, en aucun cas, être due à une augmentation de la dégradation cytoplasmique du NAD, celle-ci n'étant jamais plus élevée dans les tissus cancéreux que dans les tissus normaux comparables (QUASTEL et ZATMAN, 1953). La lésion enzymatique envisagée ci-dessus peut rendre compte aussi de la faible accumulation de NAD après injection de nicotinamide dans les tissus néoplasiques (MANDEL et COLL. 1961) et dans les organes en régénération où après infection virale (De BURGH, 1957).

Notre étude des relations entre la synthèse du NAD et celle de l'ARN nous a montré qu'il existait probablement une compétition entre les deux systèmes enzymatiques qui accomplissent ces synthèses. Cette constatation permet de rapprocher les théories de QUASTEL et BIKIS (1959) et de MORTON (1958) en une seule. Nous avons pu l'appliquer aussi bien aux tissus normaux qu'aux tissus néoplasiques. L'administration de la nicotinamide en inhibant le métabolisme de l'ARN atteint aussi celui de l'ADN et bloque les divisions cellulaires. OIDE, en 1958, a montré que l'insertion sous-cutanée d'une pastille de nicotinamide provoque une diminution du nombre des mitoses observées dans le foie du rat après hépatectomie partielle. Cette observation a été étendue par la suite aux tumeurs épidermiques par MATSUYAMA et COLL. (1961). Mais ces auteurs n'ont pas pu donner d'interprétation biochimique de leurs observations. Nous avons décrit en collaboration avec MANDEL, KLEIN et WINTZERITH et MANDEL (1961) l'action de la nicotinamide sur le métabolisme des acides nucléiques dans l'hépatome ascitique et dans le foie normal. Il est possible dans ces tissus de mesurer l'incorporation du ^{32}P dans l'ADN alors que celle-ci est insignifiante dans le rein. Le renouvellement de l'ADN et l'ARN du foie et de l'hépatome de Novikoff sont nettement diminués lorsque la synthèse de NAD est augmentée. Le pouvoir inhibiteur de la nicotinamide sur la prolifération cancéreuse relève donc bien du mécanisme ARN - NAD que nous avons décrit. Si la synthèse d'ARN est bloquée la division cellulaire est impossible, car dans un tissu adulte la reprise des mitoses nécessite l'intervention de l'ARN. En effet, la régénération hépatique qui est avant tout une hyperplasie tissulaire débute par une augmentation de l'activité de l'ARN polymérase qui assure la synthèse de la thymidilate kinase et de l'ADN polymérase indispensable à la multiplication cellulaire (BUSCH et COLL. 1962; BOLLUM, 1959; HIATT, 1960). Ceci illustre bien le rôle de l'ARN dans la replication de l'ADN chromosomique.

Les faits que nous rapportons dans cette thèse permettent de formuler une hypothèse pouvant expliquer les caractéristiques principales de la croissance normale et pathologique. Durant le développement embryonnaire, la synthèse d'ARN est intense alors que la synthèse des coenzymes à pyridine est faible. Toute l'énergie qui est produite par le métabolisme intermédiaire sous forme d'ATP est utilisée pour la formation des polynucléotides qui vont permettre une synthèse

protéique importante et l'élaboration des structures cellulaires les plus complexes. Le tissu embryonnaire vit au début de sa croissance en anaérobiose; l'acide lactique s'accumule en grandes quantités (MANDEL, BIETH, WEILL, 1956; PERTSEVA, 1961). Puis le taux de la glycolyse se réduit et on assiste à un accroissement des oxydations aérobies. Dans le développement de l'embryon de poulet, vers le 18e jour, il se produit une chute brutale de la teneur en acide lactique qui correspond au début du métabolisme aérobie. Le passage d'un type de métabolisme à l'autre dépend en grande partie du NAD présent dans la cellule. La glycolyse anaérobie réalise une économie du coenzyme: le $NADH_2$ produit dans l'oxydation du 3 phosphoglycéraldéhyde est à nouveau oxydé dans la réduction de l'acide pyruvique ou de l'hydroxyacétone phosphate (KOLOTILOVA, 1960). Cette réaction de dismutation permet à une faible quantité de NAD d'assurer une forte glycolyse anaérobie et de produire ainsi de l'ATP nécessaire à la croissance. Le passage à l'aérobiose conduit à l'apparition d'une fonction cellulaire différenciée mais exige une quantité accrue de coenzymes. L'acide pyruvique est oxydé en CO_2 et H_2O par le cycle de KREBS et n'est donc plus disponible pour les réactions de dismutation; le $NADH_2$ est oxydé par les chaînes de transporteur d'électrons mitochondriales et intervient directement dans les phosphorylations (PURVIS, 1958). Dans ces conditions d'aérobiose, il a été montré que la destruction du NAD était importante (HANGAARD et COLL. 1960). La production de NAD dans le noyau cellulaire doir donc augmenter et la formation d'ARN ainsi ralentie s'arrêtera lorsqu'un équilibre aura été établi entre les synthèses de l'ARN et des coenzymes à pyridine. Il est remarquable que la courbe du développement pondéral de l'embryon de poulet marque un arrêt de la croissance vers le 18e jour qui correspond donc à la synthèse du NAD.

Le mécanisme régulateur de la croissance basé sur la compétition ARN-NAD doit évidemment être très complexe. Cependant, on peut envisager un certain nombre de facteurs déterminants. Le passage d'un métabolisme anaérobie à l'aérobiose se fait lorsque l'équipement enzymatique mitochondrial a été mis en place. La formation de ces protéines spécifiques que sont les enzymes est commandée par un mécanisme génétique mais se fait par l'intermédiaire des ARN dont la synthèse est reliée à celle de NAD. Il s'agit donc là d'un phénomène d'autorégulation. Nous avons signalé également que la production d'ATP dépendait du taux du NAD et que le nucléoside triphosphate était ensuite utilisé pour la biosynthèse du coenzyme: là encore, un mécanisme de "feed-back" doit être envisagé. La complexité de ce système interdit dans l'état de nos connaissances une vérification expérimentale. Cependant, il faut noter que notre théorie de la diminution de la synthèse de l'ARN au fur et à mesure que celle du NAD augmente est en accord avec les données de QUASTEL et BIKIS (1959) sur la réduction progressive de l'efficacité du métabolisme embryonnaire à synthétiser les protéines. La formation du NAD qui va en croissant pourrait être la clef de ces mécanismes. Dans les tissus tumoraux des phénomènes analogues doivent exister. Le point de départ de l'altération cancérigène est encore inconnu. Mais qu'il soit viral, chimique ou génétique, les modifications qu'il apporte au métabolisme de la cellule sont assez voisines. Le point important de la théorie de WARBURG (1956) et qu'il faut conserver, est que tous les tissus cancéreux ont un caractère biochimique commun. Il y existe une forte glycolyse aérobie doublée par un effet CRABTREE. La respiration bien que le rapport P/O des oxydations ne soit pas modifié, est remplacée par une intense glycolyse qui est même capable de faire résister la cellule aux inhibiteurs des oxydations phosphorylantes (QUASTEL et BIKIS, 1959). La tumeur trouve des métabolites dans les tissus sains qu'elle envahit et détruit. Si on suppose comme MORTON (1958) que le trouble primaire de la cellule cancéreuse réside dans une faible production de NAD, l'apparition

de la glycolyse s'explique par un besoin d'économie du coenzyme. La glycolyse anaérobie permet une formation relativement importante d'ATP avec un peu de NAD mais au prix d'une utilisation importante de glucose. La réduction de la synthèse de NAD libère la formation d'ARN et la cellule synthétise sans frein des protéines qui tout en ayant les propriétés physiochimiques de certains enzymes en ont perdu l'activité biologique (POTTER, 1946). La synthèse des protéines et notamment de l'ADN polymérase est spécialement augmentée dans le noyau où elle assure la replication des chromosomes; la prolifération cellulaire peut alors se continuer indéfiniment. La fonction différenciée de la cellule disparaît parallèlement à la baisse de l'énergie fournie par le système mitochondrial. La glycolyse qui s'installe assure une intense formation de novo de nucléotides précurseurs de l'ARN (SCHMITT et COLL. 1954). Tout le métabolisme de la cellule est ainsi devié vers une activité anabolique effrenée des constituants cellulaires essentiels à l'exception de ceux assurant la différenciation.

Dans ce mécanisme hypothétique de régulation de la croissance que nous venons d'évoquer, la différenciation cellulaire apparaît comme une caractéristique des tissus sains et adultes. Cependant, certains organes, possédant une fonction élaborée comme le rein et le foie, sont capables de recommencer à se développer. C'est le cas notamment de l'hypertrophie rénale compensatrice. L'administration de nicotinamide montre que la synthèse du NAD dans le rein en hypertrophie est réduite et cela proportionnellement à l'augmentation de la synthèse d'ARN. Cette inhibition de la formation du NAD est plus faible 24 heures après le néphrectomie qu'après 48 heures: il s'agit donc là d'un phénomène passager. L. MANDEL (1955) a observé que dans le rein en hypertrophie la consommation d'oxygène est restée élevée et que le taux des composés possédant un groupement phosphorique labile diminuait légèrement. Ces faits mettent en lumière les différences essentielles qui séparent une croissance cancéreuse de l'hypertrophie compensatrice. Dans cette dernière le stimulus hypertrophiant, de nature inconnu, stimule la production d'ARN et de protéines probablement par la levée d'une répression génétique. Lorsque le stimulus cesse, la régulation ARN - NAD peut jouer et la croissance s'arrête. On n'observe pas cette transformation métabolique profonde de la cellule qui caractérise le cancer; le système de régulation n'est pas détruit, le tissu reste dans les normes physiologiques.

Un autre exemple de croissance d'un tissu différencié met en lumière le rôle du NAD. Le traitement par la thyroxine provoque chez le rat une hypertrophie importante de certains organes et notamment du rein (REVEL, 1963). La synthèse d'ARN et des protéines (SOLOKOFF et COLL. 1961) est accrue alors que celle du NAD est inhibée. Rappelons que BOSCH et HARPER (1959) ont montré que chez le rat hyperthyroidien la formation des coenzymes à pyridine après l'injection de nicotinamide était diminuée. La thyroxine provoque une lésion mitochondriale qui aboutit à une libération dans le liquide cellulaire du NAD lié aux déshydrogénases et à une diminution des oxydations phosphorylantes. L'accumulation du NAD libre pourrait provoquer par un mécanisme d'auto-régulation, l'inhibition de la formation du coenzyme. L'équilibre ARN - NAD serait déplacé et la croissance se produirait. Un tel mécanisme d'auto-régulation n'a pas encore été décrit dans les tissus animaux. Mais IMSANDE et PARDEE (1962) ont, chez les bactéries, montré qu'un excès d'acide nicotinique provoquait une répression génétique de la formation de la NaMN pyrophosphorylase qui fabrique le NaMN précurseur du NAD. C'est le premier système de régulation du taux de NAD intracellulaire qui ait été trouvé. L'intervention des hormones corticosurrénaliennes dans la synthèse de NAD a été envisagée (GREENGARD et COLL. 1961). D'autre part, la cellule cancéreuse serait incapable de fabriquer l'acide

nicotinique à partir du tryptophane et ceci pourrait être aussi un mécanisme d'autorégulation (De CLERCQ, 1961; QUAGLIARIELLO, 1958). Il est donc très probable que dans tous les tissus la synthèse du NAD peut varier suivant les besoins et suivant les conditions métaboliques. Notre interprétation de l'action de la thyroxine n'est donc pas seulement hypothétique.

Quoiqu'il en soit, de tous ces faits, c'est-à-dire la corrélation entre les synthèses de NAD et d'ARN au cours de l'HRC, dans la croissance embryonnaire et dans la croissance tumorale, se dégage la notion d'une régulation de la croissance basée sur l'équilibre ARN - NAD. Dans tous les tissus qui ont une synthèse d'ARN importante, l'activité de la NMN-adénylyl transférase serait réduite soit par une destruction de l'enzyme (ce serait le cas de la lésion cancéreuse, MORTON, 1958) soit par le manque d'un précurseur NMN ou ATP. Au contraire les cellules qui ont un besoin accru de NAD parce que leurs oxydations sont intenses fabriqueront moins d'ARN. Ce sont donc avant tout les mécanismes qui règlent le taux du NAD intracellulaire, c'est-à-dire le métabolisme énergétique tout entier, qui vont jouer le rôle capital dans le contrôle de la croissance. Il n'est pas certain que leurs effets se limitent aux nucléotides à pyridine; les coenzymes flaviniques participent probablement à ces phénomènes (POTTER, 1946; ROSENBERG et COLL. 1959).

La corrélation ARN - NAD a donc des conséquences importantes sur le plan théorique. Nos résultats fournissent une base expérimentale permettant de comprendre les propriétés des tissus embryonnaires ou cancéreux et surtout elle justifie du point de vue expérimental les théories sur la croissance qui ont été proposées ces dernières années par QUASTEL et BIKIS (1959), reprenant les idées de WARBURGH, d'une part, et par MORTON (1958) d'autre part. Mais notre étude trouve également son application pratique: la nicotinamide a été essayée avec succès comme agent anticancéreux (MATSUYAMA et COLL. 1961). Cependant, les espoirs en ce domaine restent limités. Le tissu cancéreux n'est pas capable de former de grandes quantités de NAD après l'injection de la vitamine, l'inhibition de la synthèse de l'ARN ainsi provoquée reste donc relativement faible. Le résultat dépendra du type de néoplasme envisagé: ainsi, nous avons pu agir sur l'hépatome de NOVIKOFF (REVEL et COLL. 1961), alors que celui de ZAJDELA reste insensible. L'abaissement du taux des coenzymes à pyridine dans la cellule tumorale finit par causer la mort de la cellule cancéreuse. L'injection de nicotinamide, surtout si elle est de courte durée, peut avoir un effet favorisant sur la prolifération parce qu'elle rétablit pour un instant un taux de NAD plus élevé (HILZ et COLL. 1961). A l'opposé ceci explique également l'action de certains composés anticancéreux étudiés par HOLZER (1958) qui abaissent la concentration du NAD au dessous d'une valeur critique et tuent la tumeur. Ces médicaments agissent en activant la dégradation du coenzyme. Un des rares agents inhibiteurs de la synthèse du NAD qui fait partie du groupe des podophyllines (WARAVDEKAR et COLL. 1956) stimule au contraire les mitoses (CORTINI 1955) en accord avec l'équilibre ARN - NAD que nous avons décrit. L'applicationthérapeutique des résultats de nos recherches reste donc difficile, car l'effet dépend du niveau de synthèse de NAD. Néanmoins, nos observations nous sembleront avoir porté leurs fruits si elles permettent une meilleure compréhension du mécanisme régulateur de la croissance.

RESUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons recherché dans notre travail à mettre en évidence une relation entre le métabolisme des acides ribonucléiques et celui des coenzymes à pyridine qui soit susceptible d'expliquer les mécanismes de la régulation des croissances cellulaires.

Nous avons confirmé d'abord que l'administration de nicotinamide (500 mg/kg) provoque dans le rein du rat un accroissement de la synthèse de NAD. Nous avons précisé la cinétique de ce phénomène ainsi que le taux de NADP formé parallèlement au NAD. La teneur du rein en coenzymes à pyridine passe par un maximum 13 heures après l'injection de nicotinamide et atteint 5,5 fois sa valeur de départ.

Après deux injections de nicotinamide à 13 heures d'intervalle, l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN rénal est nettement diminuée. Dans le rein en hypertrophie on observe la sommation algébrique des effets de l'HRC et de la nicotinamide sur le renouvellement de l'ARN. L'ensemble des faits indique une réduction du turnover de l'ARN sous l'effet d'une synthèse accrue de NAD.

Le traitement prolongé par l'amide nicotinique inhibe la néosynthèse nette d'ARN et de protéines qui se produit normalement dans le rein en hypertrophie après 4 à 5 jours. Ainsi la réduction du renouvellement que nous avons constaté 24 heures après l'injection de nicotinamide reflète bien une baisse de la synthèse d'ARN.

Le taux de NAD produit après l'administration de nicotinamide est plus faible dans le rein en hypertrophie que dans le même organe au repos.

Il y a une relation inversement proportionnelle entre les quantité d'ARN et de NAD formées, au cours de l'HRC avec administration de nicotinamide. Ceci établit l'existence d'une corrélation entre le métabolisme de l'ARN et celui du NAD dans le type de tissu envisagé.

L'étude détaillée de cette corrélation a conduit aux observations suivantes. L'inhibition de l'incorporation du $^{32}PO_4$ dans l'ARN du noyau peut déjà être observée 13 heures après une injection unique de nicotinamide; à ce moment là aucune variation dans l'ARN cytoplasmique n'est encore observée. Ceci indique que la stimulation de la formation du NAD exerce son action sur l'ARN du noyau cellulaire, action qui se répercute ensuite sur l'ensemble des ARN de la cellule.

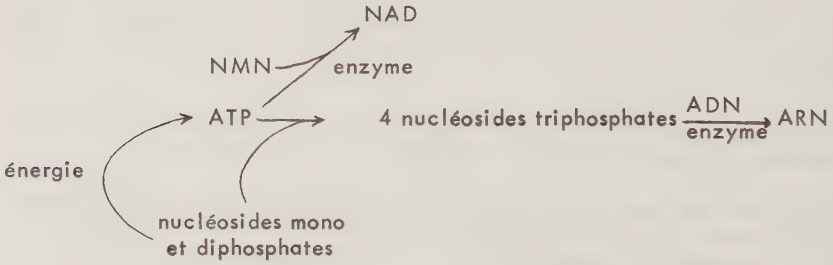
Pour préciser le site de cette action nous avons procédé à un fractionnement de l'ARN nucléaire. Il est apparu que le noyau contient plusieurs types d'ARN: ARN soluble 4 S, ARN ribosomique 20 S et 30 S et ARN messager qui sont répartis dans les divers compartiments nucléaires (suc nucléaire, fraction chromosomique contenant l'ADN, fractions nucléolaires I et II). Une fraction de l'ARN nucléaire, qui incorpore rapidement les précurseurs radioactifs, quitte les noyaux au cours de l'incubation in vitro. Cet ARN est de haut poids moléculaire et peut se fixer sur les ribosomes en présence de Mg^{++}. Le caractère messager de ce type d'ARN paraît très vraisemblable.

L'effet de la nicotinamide s'exerce d'abord sur la synthèse de l'ARN ribosomique nucléolaire. Une action sur l'ARN messager n'est pas cependant exclue.

L'action de la nicotinamide a pu être reproduite avec des noyaux isolés incubés en présence de NMN et d'ATP. La formation du NAD, que l'on observe, provoque une inhibition de l'incorporation de l'adénine-8-^{14}C et de l'acide orotique-6-^{14}C dans l'ARN. L'ATP extranucléaire, ajouté dans le milieu d'incubation, quoiqu'indispensable pour la synthèse de NAD, n'est pas utilisé directement ni pour la formation du coenzyme ni pour celle de l'ARN. Il existe des pools d'ATP intranucléaires qui assurent les synthèses du noyau; la formation de l'ATP dans le noyau ne peut être inhibée que par de fortes concentrations de DNP.

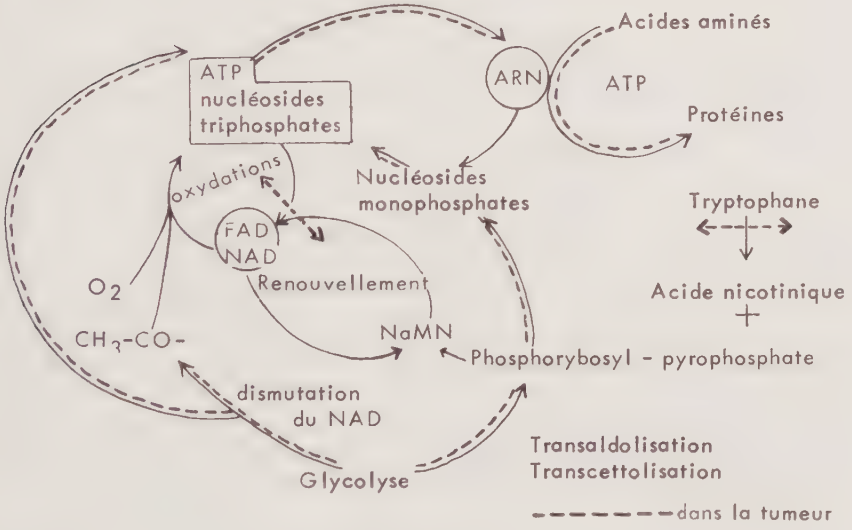
Nous avons vérifié que c'est la formation des chaînes polynucléotidiques de l'ARN à partir des nucléosides triphosphates qui est inhibée par le NMN. De plus le NMN stimule fortement dans le noyau une synthèse d'acide polyadénylique. Il est possible que ce fait soit en relation avec le mécanisme de la relation ARN - NAD.

L'ensemble des phénomènes observés in vivo et in vitro permet d'affirmer l'existence d'un équilibre entre les synthèses d'ARN et de NAD: plus la formation du coenzyme est grande, plus celle de l'acide nucléique est réduite. C'est dans le noyau cellulaire qu'est localisée cette corrélation que l'on peut schématiser ainsi :



La synthèse de l'ARN ribosomique nucléaire, puis celle de l'ARN ribosomique cytoplasmique comme le montrent nos expériences, sont réduites sous l'effet de l'injection de nicotinamide. On conçoit que cette inhibition du métabolisme de l'ARN ribosomique, jointe peut être à celle de l'ARN messager, affecte les synthèses protéiques et rend le tissu incapable de reprendre une croissance au cours de l'HRC.

On peut ainsi envisager un mécanisme de régulation commun à la croissance embryonnaire, tumorale et aux phénomènes de régénération et d'hypertrophie. Dans les tissus jeunes, le taux de synthèse peu élevé de NAD s'accompagne de biosynthèse active d'ARN, de protéines et d'ADN, c'est-à-dire d'une prolifération rapide; l'augmentation du niveau de synthèse de NAD par une adaptation progressive au métabolisme aérobie, en même temps que se réalise la différenciation cellulaire, s'accompagne d'une réduction du potentiel de croissance des cellules. Le retour à un état de croissance telle que le présente l'HRC ou la prolifération cancéreuse implique une modification des rapports entre la synthèse du NAD et celle de l'ARN. Les particularités métaboliques des tissus à prolifération rapide tels que les tumeurs trouvent alors leur explication, comme l'indique le schéma suivant, qui met en évidence un trouble de l'utilisation de l'énergie (ATP) qui rejaillit sur le métabolisme énergétique par l'intermédiaire de la diminution du taux du NAD.



Enfin, les phénomènes que nous avons décrits montrent que le noyau contrôle le développement cellulaire en fournissant au cytoplasme l'ARN et le NAD qui lui sont indispensables.

BIBLIOGRAPHIE

ALLFREY V. G. et MIRSKY A. E. 1957 Proc. Natl. Acad. Sci. **43** 589

ALLFREY V. G. et MIRSKY A. E. 1957 Proc. Natl. Acad. Sci. **43** 821

ALLFREY V. G., MIRSKY A. E. et OSAWA S. 1955 Nature **176** 1042

ALLFREY V. G., MIRSKY A. E. et OSAWA S. 1957 J. Gen. Physiol. **40** 451

ATKISON M. R., JACKSON J. F. et MORTON R. K. 1961 Nature **192** 946

BARNUM C. P. et HUSEBY R. A. 1950 Arch. Biochem. **29** 7

BEHRENS M. 1932 Zeits. Physiol. Chem. **209** 59

BELL R. D. et DOISY E. A. 1920 J. Biol. Chem. **44** 55

BERENBLUM J. et CHAIN E. 1938 Biochem. J. **32** 286

BIRNSTIEL M. L., CHIPCHASE M. et BONNER J. 1961 Biophys. Biochem. Res. Comm. **6** 161

BISWAS B. B. et ABRAMS R. 1962 Biochim. Biophys. Acta **55** 827

BOLLUM F. J. et POTTER V. R. 1959 Cancer Research **19** 561

BOSCH A. J. et HARPER A. E. 1959 J. Biol. Chem. **234** 929

BRACHET J. 1941 Arch. Biol. Liège **53** 205

BRACHET J. 1960 dans Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth. page 260. ELSEVIER, Amsterdam

BRACHET J. et SZAFARZ D. 1953 Biochim. Biophys. Acta **12** 588

BRANSTER M. J. et MORTON R. K. 1956 Biochem. J. **63** 640

BREITMAN T. R. et WEBSTER G. C. 1959 Exptl. Cell. Res. **18** 413

BRIGGS A. P. 1922 J. Biol. Chem. **53** 13

BROWNHILL T. J., JONES A. S. et STACEY M. 1959 Biochem. J. **73** 434

BURDON R. H. et SMELLIE R. M. S. 1961 Biochim. Biophys. Acta **51** 153

BUSCH S., CHAMBON P., MANDEL P. et WEILL J. D. 1962 Biochem. Biophys. Res. Comm. **7** 255

CARRUTHERS C. et SUNTZEFV V. 1953 Arch. Biochem. and Biophys. **45** 140

CASPERSON T. O. 1941 Naturwissenschaften **28** 33

CASPERSON T. O. 1950 Cell growth and cell function. WW NORTON et Co New York 185 p.

CHAMBON P., WEILL J. D., MANDEL P. 1963 Biochem. Biophys. Res. Comm. (sous presse)

CHAUVEAU J., MOULE Y. et ROUILLER Ch. 1957 Bull. Soc. Chim. Biol. **39** 1521

CHEN P. S., TORIBARA T. Y. et WARNER H. 1956 Anal. Chem. **28** 1756

CHENG P.-Y. 1959 Nature **184** 190

CHENG P.-Y. 1961 Biochim. Biophys. Acta **53** 235

CIOTTI M. M. et KAPLAN N. O. 1957 Methods in Enzymology III p. 890 Acad. Press, New York

CLERCQ (De) M. 1961 Pathol. Biol. **9** 349

COLTER J. S., BROWN R. A. et ELLEM K. A. O. 1962 Biochim. Biophys. Acta **55** 31

CORTINI C. 1955 Caryologia **7** 72

CROSBIE G. W., SMELLIE R. M. S. et DAVIDSON J. N. 1953 Biochem. J. **54** 287
DAVIDSON J. N. 1960 La biochimie des acides nucleiques. Dunod. Paris
DE BURGH 1957 Austral. J. of Sci. **20** 86
DUVE (De) C., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et F. APPELMANS 1955 Biochem. J. **60** 605
DIRHEIMER G., WEIL J. et EBEL J.-P. 1962 Compt. Rend. **255** 2312
DISCHE Z. 1930 Mikrochem. **2** 4
DOUNCE A. L. 1943 J. Biol. Chem. **147** 685
ELSON D., TRENT et CHARGAFF E. 1955 Biochim. Biophys. Acta **17** 362
EL'TSINA N. V. 1960 Biochemistry **25** 97
ERRERA M. et VANDERHAEGHE F. 1957 Exptl Cell Res. **13** 1
FISHER A. et SCHLENK F. 1948 Tex. Rep. Biol. Med. **6** 346
FRENSTER J. H., ALLFREY V. G. et MIRSKY A. E. 1960 Proc. Natl. Acad. Sci. **46** 432
GALE E. F. et FOLKES J. P. 1954 Nature **173** 1223
GEIDUSHEK E. P., MOOHR J. W. et WEISS S. B. 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. **48** 1078
GEORGIEV G. P. 1961 Biochemistry **26** 945
GEORGIEV G. P. et CHENTSOV J. S. 1962 Exptl. Cell Res. **27** 570
GEORGIEV G. P. et MANTIEVA V. L. 1961 Biochemistry **26** 143
GEORGIEV G. P. et MANTIEVA V. L. 1962 Biochim. Biophys. Acta **61** 153
GEORGIEV G. P. et SAMARINA O. P. Biochemistry **26** 401
GERSHANOVICH V. N., AGOL V. I., ETINGOF R. N. et DZAGUROV S. G. 1958 Biochemistry **23** 422
GIERER A. 1958 Z. Naturforsch. **136** 788
GLOCK G. E. et Mc LEAN P. 1957 Biochem. J. **65** 413
GREENGARD P., QUINN G. P. et LANDRAU M. A. 1961 Biochim. Biophys. Acta **47** 614
GROS F., HIATT H. H., GILBERT C., KURLAND G., RISEBROUGH R. W. et WATSON J. D. 1961 Nature **190** 581
GRUNBERG-MANAGO M. et OCHOA S. 1955 J. Am. Chem. Soc. **77** 3165
HALL B. D. et DOTY P. 1959 J. Mol. Biol. **1** 111
HANDLER P. et DANN W. J. 1942 J. Biol. Chem. **146** 357
HANGAARD N., INESI G. et BLANKEN R. R. 1960 Arch. Biochem. and Biophys. **90** 31
HARRIS H. et WATTS J. W. 1962 Proc. Roy. Soc. B, **156** 109
HARSHAW J. P., BROWN R. A. et GRAHAM A. F. 1962 Anal. Biochem. **4** 182
HERSHEY A. D. et BURGI E. 1960 J. Mol. Biol. **2** 143
HIATT H. H. 1962 J. Mol. Biol. **5** 217
HIATT H. H. et BOJARSKI T. D. 1960 Biochem. Biophys. Res. Com. **2** 35
HILMOE R. J. et HEPPEL L. A. 1957 J. Am. Chem. Soc. **79** 4810
HILZ H., v. GOSSLER M., OLDEKOP M. et SCHOLZ M. 1961 Biochem. Biophys. Res. Comm. **6** 379
HOAGLAND M. B., ZAMECNIK PC et STEPHENSON M. L. 1957 Biochim. Biophys. Acta **24** 215
HOGEBOOM E. H. et SCHNEIDER W. C. 1952 J. Biol. Chem. **197** 611
HOGEBOOM E. H. et SCHNEIDER W. C. 1955 The nucleic Acids **2** 199
HOGEBOOM E. H., SCHNEIDER W. C. et STRIEBICH M. J. 1952 J. Biol. Chem. **196** 111
HOLZER H. et KROGER H. 1958 Biochem. Zeitsch. **330** 579

HURWITZ J., FURTH J. J., ANDERS H., ORTIZ P. J. et AUGUST J. T. 1961 Cold Spring Harbor Symposia **26** 91
IMSANDE J. et BARDEE A. B. 1962 J. Biol. Chem. **237** 1305
ISHIHAMA A., MIZUNO N., TAKAI M., OTAKA E. et OSAWA S. 1962 J. Mol. Biol. **5** 251
JACOB F. et MONOD J. 1961 J. Mol. Biol. **3** 318
JACOB J. et SIRLIN J. L. 1962 Biochem. J. **84** 88 p
JEDEIKIN L. A. et WEINHOUSE S. 1955 J. Biol. Chem. **213** 271
KALCKAR H. 1947 Symp. Soc. Exp. Biol. **1** 38
KAPLAN N. O. COLLOWICK S. P. et BARNES C. C. 1951 J. Biol. Chem. **192** 461
KAPLAN N. O., GOLDIN A., HUMPHREYS S. R., CIOTTI M. M. et STOLZENBACH F. E. 1956 J. Biol. Chem. **219** 287
KARA J. et SORM F. 1959 Neoplasma **3** 225
KENSLER C. J., SUGIURA K. et RHOADS C. P. 1940 Science **91** 623
KIRBY K. S. 1956 Biochem. J. **64** 405
KOLOTILOVA A. I. 1960 Biochemistry **25** 313
KORNBERG A. 1950 J. Biol. Chem. **182** 779
KORNBERG A. et HORECKER B. L. 1953 Biochem. Preparations **3** 23
KORNBERG A., LIEBERMANN I. et SIMMS E. S. 1955 J. Biol. Chem. **215** 417
KUBINSKI H., KOCH G. et DREES O. 1962 Biochim. Biophys. Acta **61** 332
KURLAND C. G. 1960 J. Mol. Biol. **2** 83
LANGAN T. A., KAPLAN N. O. et SHUSTER L. 1959 J. Biol. Chem. **234** 2161
LEBARON F. N. et FOLCH J. 1956 J. Neurochem. **1** 101
LEDIG M., FEIGENBAUM H. et MANDEL P. 1961 Compt. Rend. **253** 2003
LERMANN L. S. 1955 Biochim. biophys. Acta **18** 132
LOGAN R. 1957 Biochim. Biophys. Acta **26** 227
LOGAN R. et DAVIDSON J. N. 1957 Biochim. Biophys. Acta **24** 196
LOWRY O. H., ROBERTS N. R. et KAPPHAHN J. I. 1957 J. Biol. Chem. **224** 1047
MACHEBOEUF M. et DELSAL J. L. 1943 Bull. Soc. Chim. Biol. **25** 116
MANDEL L. Thèse de doctorat d'état ès sciences Strasbourg 1955 248 p.
MANDEL L., WINTZERITH M., KLEIN N. et MANDEL P. 1961 Nature **191** 467
MANDEL P., BIETH R. et WEILL J. D. 1956 Metabolism of the nervous syst. Proc. Intern. Neurochem. Symposium 2 è, Aarhus p. 291
MANDEL P., JACOB M. et MANDEL L. 1950 Bull. Soc. Chim. Biol. **33** 80
MANDEL P., MANDEL L. et JACOB M. 1950 Compt. Rend. **230** 786
MANDEL P., WEILL J. D., LEDIG M. et BUSCH S. 1959 Nature **183** 1114
MANDELL J. D. et HERSHEY A. D. 1960 Anal. Biochem. **1** 66
MARSHAK A. 1948 J. Cellular and compared Physiol. **32** 481
MATSUYAMA M., MAEKAWA A., NAGAYO T. 1961 Nature **189** 673
MEJBAUM W. 1939 Z. Physiol. Chem. **258** 117
MERITS I. 1963 Biochem. Biophys. Res. Comm. **10** 254
MIRSKY A. E. et OSAWA S. 1961 The Cell. Acad. Press New-York, **2** p. 677
MITCHELL J. S. 1960 The Cell Nucleus Butterworth et Co, Londres
MIZUNO S., YOSHIDA E., TAKAHASHI H. et MARUO B. 1961 Biochim. Biophys. Acta 49 369
MONIER R. 1962 Biochim. Biophys. Acta **55** 1001
MONIER R., NAONO S., HAYES D., HAYES F. et GROS F. 1962 J. Mol. Biol. **5** 311
MORTON R. K. 1958 Nature **181** 540
NAKAMOTO T. et WEISS S. B. 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. **48** 880

NATHANS D., von EHRENSTEIN G., MONRO R. et LIPMANN F. 1962 Fed. Proc. **21** 127
OIDE H. 1958 Gann. **49** 49
OCHOA S., BURMA D. P., KRÖGER H. et WEILL J. D. 1961 Proc. Natl. Acad. Sci. **47** 670
OSAWA S., TAKATA K. et HOTTA Y. 1957 Biochim. Biophys. Acta **25** 656
OTAKA E., MITSUI H. et OSAWA S. 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. **48** 425
OTAKA E., OSAWA S., OOTA Y., ISHIHAMA A. et MITSUI H. 1962a Biochim. Biophys. Acta **55** 310
PALADE G. E. et SIEKEVITZ P. 1956 J. Biophys. Biochem. Cytol **2** 171
PARDEE A. B. 1954 Proc. Natl. Acad. Sci. **40** 263
PEREY M., MANDEL P., JACOB M. et MANDEL L. 1953 Compt. Rend. **237** 580
PERRY R. P., HELL A. et ERRERA M. 1960 Proc. 10 è Intern. Congress Cell Biology. PARIS, p. 110
PERRY R. P., HELL A. et ERRERA M. 1961 Biochim. Biophys. Acta **49** 47
PERTSEVA N. 1961 Biochemistry **26** 228
POTTER V. R. 1946 Adv. in Enzymology **4** 201
PREISS J. et HANDLER P. 1958 J. Biol. Chem. **233** 488
PRESCOTT D. M. 1960 Ann. Rev. Physiol. **22** 17
PRICE W. H. 1952 J. Gen. Physiol. **35** 741
PURVIS J. 1958 Nature **182** 711
QUAGLIARIELLO E. et AURICCHIO S. 1958 Rend. ed. atti. accad. sci. med. chir. **112** 55
QUASTEL J. H. et BICKIS I. J. 1959 Nature **183** 281
QUASTEL J. H. et ZATMAN L. J. 1953 Biochim. Biophys. Acta **10** 256
REVEL M. 1963 Thèse de doctorat en médecine, Strasbourg
REVEL M., MANDEL L., WINTZERITH M., KLEIN N. et MANDEL P. 1961 Bull. Soc. Chim. Biol. **43** 91
RHO J. H. et BONNER J. 1961 Proc. Natl. Acad. Sci. **47** 1611
RISEBROUGH R. W., TISSIERES A. et WATSON J. D. 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. **48** 430
ROSENBERG A. J., HURST L. et EMANOIL R. 1959 Compt. Rend. **248** 1052
ROTMAN B., et SPIEGELMAN S. 1954 J. Bact. **68** 419
RUTMANN R. J. et GEORGES P. 1961 Proc. Natl. Acad. Sci. **47** 1094
SARMA D. S. R., RAJALAKSHMI S. et SARMA S. P. 1961 Biochem. Biophys Res. Comm. **6** 389
SCHERRER K. et DARNELL J. E. 1962 Biochem. Biophys. Res. Comm. **7** 486
SCHMALHAUSEN J. 1931 Arch. Entwicklungsmech. Organ. **123** 152
SCHMIDT G. et TANNHAUSER S. J. 1945 J. Biol. Chem. **161** 293
SCHMITZ H., POTTER V. R. et HURLBERT R. B. 1954 Cancer Research **14** 58
SCHMITZ H. et SAUKKONEN J. S. 1955 Congr. Intern. Biochem. Résumés Communs **3** Bruxelles p. 72
SCHNEIDER W. C. 1945 J. Biol. Chem. **161** 293
SCHOLTISSEK C. 1962 Nature **194** 353
SCHWEIGER H. G. et BREMER M. J. 1960 Exptl. Cell Res. **20** 617
SHUSTER L. et GOLDIN A. 1958 J. Biol. Chem. **230** 873
SHUSTER L. et GOLDIN A. 1959 J. Biol. Chem. **234** 129
SIBATANI A., De KLOET S. R., ALLFREY V. G. et MIRSKY A. E. 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. **48** 471
SIEBERT G. 1960 dans: The Cell Nucleus p. 176 Proc. Farad. Soc. Butterworth et Co, LONDRES

SIEBERT G. 1961 Biochem. Zeitsch. **334** 369
SIEBERT G., BASSLER K. H., HANNOVER R., ADLOFF E. et BEYER R. 1961 Biochem. Zeitsch. **334** 388
SIEBERT G. et SMELLIE R. M. S. 1957 Intern. Rev. Cytol. **6** 383
SPIEGELMAN S., HALL B. D. et STORCK R. 1961 Proc. Natl. Acad. Sci. **47** 1135
SOKOLOFF L. et KAUFMAN S. 1961 J. Biol. Chem. **236** 795
STOLLAR V. et KAPLAN N. O. 1961 J. Biol. Chem. **236** 1863
STRAUS D. B. et GOLDWASSER R. E. 1961 J. Biol. Chem. **236** 849
SUEOKA N. et CHENG T. Y. 1962 J. Biol. **4** 161
TISSIERES A. 1959 J. Mol. Biol. **1** 365
TISSIERES A. 1961 Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology **26** 122
TSANEV R. G. et MARKOV G. G. 1960 Biochemistry **25** 109
TYNER E. P., HEIDELBERGER C. et LE PAGE G. A. 1953 Cancer Research **13** 186
VENDRELY R. 1946 Symposium sur les proteines MASSON, Paris
VINCENT W. S. 1957 Science **126** 306
VOLKIN E. et CARTER C. E. 1951 J. Am. Chem. Soc. **73** 1516
VON BERTALANFFY L. 1960 dans Fundamental aspects of normal and malignant growth p. 137 ELSEVIER, Amsterdam
WARAVDEKAR V. S. et POWERS O. H. 1957 J. Natl. Cancer Inst. **18** 145
WARAVDEKAR V. S., POWERS O. H. et LEITER J. 1956 J. Natl. Cancer Inst. **17** 145
WARBURG O. 1956 Science **123** 309
WATSON J. D. et CRICK F. H. C. 1953 Nature **171** 964
WEILL J. D. 1958 Thèse d'état de doctorat ès sciences, Strasbourg 176 p.
WEILL .J D. et LEDIG M. 1957 Compt. Rend. Soc. Biol. **151** 1587
WEINHOUSE S. 1956 Science **124** 267
WEISS S. B. 1960 Proc. Natl. Acad. Sci. **46** 1020
YANKOFSKY S. A. et SPIEGELMAN S. 1962 Proc. Natl. Acad. Sci. **48** 1069
ZALOKAR M. 1959 Nature **183** 1330
ZAMECNIK P. C. et KELLER E. B. 1954 J. Biol. Chem. **209** 337
ZBARSKY I. B. et GEORGIEV G. P. 1959 Biochim. Biophys. Acta **32** 301

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde thèse :

"DONNEES RECENTES SUR LE MECANISME DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES".

Strasbourg, le 10 Mai 1963

Le Président de Thèse:
L. HIRTH

VU,
Strasbourg, le 10 Mai 1963

LE DOYEN,

p. le Doyen,
l'Assesseur
J. BRENET

Vu et permis d'imprimer
Strasbourg, le 11 Mai 1963

LE RECTEUR de l'Académie de Strasbourg,
Président du Conseil de l'Université
J. F. ANGELLOZ

ACHEVÉ D'IMPRIMER
SUR LES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE SICOP
67, Avenue de Périgueux
BISCHHEIM (BAS-RHIN)
MAI 1963

DÉPOT LÉGAL 2e TRIMESTRE 1963